



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS

**EFEECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON
ISOFLURANO Y SEVOFLURANO SOBRE EL
ELECTRORRETINOGRAMA EN EL PERRO:
NORMOCAPNIA E HIPERCAPNIA.**

**Memoria presentada por el Licenciado en
Veterinaria D. Óscar Varela López para
optar al Grado de Doctor.**

**Óscar Varela López
Lugo, Septiembre de 2006**



**DEPARTAMENTOTO DE CIENCIAS
CLÍNICAS VETERINARIAS**

Facultade de Veterinaria
Campus de Lugo
E-27002 Lugo (Spain)
Telf. 982 285 900 , ext. 22741
Correo electrónico: ccvsec@lugo.usc.es

Dr. D. Antonio González Cantalapiedra, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Efecto de la anestesia inhalatoria con isoflurano y sevoflurano sobre el electrorretinograma en el perro: normocapnia e hipercapnia”**, presentado por el licenciado D. Óscar Varela López para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Cirugía y Patología Quirúrgica del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela. Revisado el presente estudio, quedo conforme con su presentación para ser juzgado.

A los efectos oportunos firmo el presente informe

En Lugo, Septiembre de 2006

Fdo. Antonio González Cantalapiedra

A José Luis

A mis padres, a mis abuelos y a Bea
porque me lo han dado todo

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS:

Con sumo placer redacto este apartado, ya que representa en cierto modo la satisfacción de un trabajo terminado, pero sobre todo me ofrece la ocasión de plasmar mi más sincero agradecimiento a toda la gente que hizo de un modo u otro que esté escribiendo estas líneas.

Hay una persona en particular a la que nunca estaré lo suficientemente agradecido, no solo por lo mucho que ha hecho para que este trabajo saliera adelante, sino también por todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi incipiente carrera profesional. Estoy hablando del Dr. José Luis Pereira Espinel, a quien tengo el orgullo de dedicar este modesto tomo. Gracias a sus consejos e indicaciones he aprendido infinidad de cosas que sin duda me servirán a lo largo de mi vida. Por otra parte, tengo que agradecerle entre otras cosas, la gran paciencia que ha demostrado tener conmigo y la amabilidad con la que siempre me ha tratado. Por hacerme amar la profesión, de verdad gracias.

He sido estupendamente dirigido por el Dr Antonio González Cantalapiedra, el cual además de ser un excelente amigo ha sido un tutor excepcional. He de decir que lo poco que se del mundo de la veterinaria se lo debo a él. No importaba el día o la hora en la que surgiesen las dudas, siempre estuvo disponible con el buen humor que le caracteriza. Hace ya unos años, pero aún recuerdo a la perfección el día en que le dije que quería hacer el doctorado y le pedí que fuera mi director. Ya imagináis lo que respondió, aunque quizás estuviese pensando: "no sabes donde te metes". La verdad es que no sabía muy bien donde me metía, pero puedo decir sin miedo a equivocarme que volvería a ponerme bajo su tutela con mucho gusto.

Como no podía ser de otra manera tengo que hacer mención especial al futuro Doctor Juan Carlos Álvarez Vázquez. Puedo asegurar que este trabajo no se hubiera llevado a cabo sin su inestimable ayuda. Fueron muchos los momentos que pasamos en escotópico, lo cual posiblemente reforzó la amistad que ya nos unía. Muchas gracias Juan Carlos, por siempre estar ahí y por enseñarme tantas cosas de la vida y del resto. Mi compañero de batalla, Mariano, hemos crecido juntos profesionalmente, le tengo que dar las gracias por los ánimos que me prestó en mis momentos bajos, por cubrirme las espaldas cuando lo necesité y por ser tan buen compañero. Muchas gracias a Roberto, que siempre un paso por delante, me va guiando por el buen camino. Natalia y Eva, mis pequeñas compañeras de promoción, siempre tan agradables y dispuestas a ayudar, por supuesto también tienen cabida en este apartado, así como sus parejas

Luciano y Marcos respectivamente, que también me han ayudado un montón. Gracias a Blanquita, por ser como es, una de las mejores personas que conocí. No importa cuando ni donde siempre está disponible para arrancarme una sonrisa y hacer que me olvide del estrés cotidiano.

Mi más sincero agradecimiento también va dirigido a Bea, la maravillosa persona con la que tengo la inmensa fortuna de compartir mi vida. Si alguien sabe en primera persona lo difícil que en ocasiones se hace convivir con un doctorando, sin duda esa es Bea. Gracias por aguantar mis cambios de humor, mi insomnio, mis ansiedades, etc. En definitiva, gracias por estar ahí cuidando de mí, apoyándome en los malos ratos y haciéndome feliz.

Quisiera también dar las gracias al Dr Lazard, colega francés, ya que fue quien me abrió las puertas y descubrió los entresijos de esta apasionante aunque en ocasiones enrevesada disciplina, la electrofisiología ocular, gracias por el tiempo que me ha dedicado. También de más allá de los pirineos procede el Dr Rosolen, destacado experto en este campo, al que le debo gran parte de este trabajo. Gracias por prestarme su inestimable y desinteresado apoyo, sin duda ha ejercido una gran labor de tutor on-line. A mi amigo Víctor Hugo, que aunque no pertenece al mundo de la veterinaria, me ha echado un cable en más de una ocasión, entre otras cosas con el inglés que domina a la perfección. Mi compañera y también amiga Raquel García, me ayudó mucho a su manera y por ello quiero expresarle mi gratitud. También agradezco a la Dra Belén Gómez y a Expósito el cable que me echaron en un momento clave. Mis buenos amigos, Marta y Franki, me ofrecieron los ánimos y el afecto que necesité en todo momento, a ellos les quiero también agradecer el buen trato que siempre han tenido conmigo.

Muchísimas gracias a todos mis compañeros de trabajo de la fundación Rof Codina, a su gerente Luis Felipe De La Cruz Palomino, por cedernos la infraestructura, a mis compañeros de medicina interna, Marus, Germán, Ana Goicoa y Fidalgo. Sin olvidar, a todos los residentes, facultativos y becarios, además de los cuidadores, siempre tan dispuestos. Muchas gracias al Dr Fernando Muñoz, al Dr Andrés Barreiro y a la Dra Ana López por el apoyo prestado. A todos ellos muchas gracias por crear un ambiente laboral estupendo. Gracias por supuesto a la Secretaría Xeral de I+D de la Xunta, que me proporcionó becas durante los últimos años. No quiero terminar este apartado sin expresar mi agradecimiento y cariño a todos los perros utilizados en este experimento, sin duda fueron los auténticos protagonistas.

A mi familia se lo debo todo, mi padre Antón, posiblemente sea el que más ganas tiene de que termine este trabajo, gracias por andarme encima. Gracias a mi madre, Ledi, por ser la mejor madre que se puede tener, gracias a mis hermanos Benxa y Montse, cada uno a su manera supieron infundirme ánimos y expresarme su cariño. Gracias a mi abuela y madrina María y a mi abuelo Manolo, ambos me educaron en las primeras etapas de mi vida, me vieron crecer y madurar y tienen mucho que ver con el hecho de que haya llegado hasta aquí, gracias también por supuesto a mi abuela Segunda.

A todas estas personas y a mis amigos de Melide, de Lugo y de Coruña, muchísimas gracias.

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS:

AERG:	adapto-electrorretinograma
AMPA/KA:	alfa-amino-3-hidroxi-metil-4-ácido isoxazolepropiónico/kainato
APB:	ácido DL-2-amino-4-fosfonobutírico
ASP:	aspartato
ATP:	adenosina trifosfato
CAM:	concentración alveolar mínima
CCG:	capa de células ganglionares
cd/m².s:	candelas/metro cuadrado. Segundo
cm:	centímetros
CMR:	commom mode rejection
CNE:	capa nuclear externa
CNI:	capa nuclear interna
CPE:	capa plexiforme externa
CPI:	capa plexiforme interna
CV:	coeficiente de variación
DNQX:	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
DT:	dark through
ECVO:	European College of Veterinary Ophthalmologists
EEG:	electroencefalograma
EOG:	electro-oculograma
EPR:	epitelio pigmentario
ERG(s):	electrorretinograma(s)
FC:	frecuencia cardiaca
FDE:	fosfodiesterasa
FEFCO₂:	fracción espiratoria final de CO ₂
fERG:	electrorretinograma focal
FiO₂:	fracción inspiratoria de oxígeno
FR:	fotorreceptores
ft:	foot-candle
GABA:	ácido gamma amino butírico

Abreviaturas

GMP_C : guanosina monofosfato cíclico
GTP : guanosina trifosfato
HI : células horizontales tipo 1
III : células horizontales tipo 2
III : células horizontales tipo 3
Hz : Hertzios
in : inches
IR : iluminación retiniana
ISCEV : International Society for Clinical Electrophysiology of Vision
kΩ : kiloohmio
l : litros
lm : lumen
LP : light peak
lx : lux
mfERG : electrorretinograma multifocal
mg : miligramos
ml : mililitros
mm : milímetros
mM : milimoles
mmHg : milímetros de mercurio
ms : milisegundos
mV : milivoltios
nt : nit
nm : nanómetros:
NMDA : N-metil-D-aspartato
NO : nervio óptico
°C : grados centígrados
OP(s) : potencial(es) oscilatorio(s)
PaCO₂ : presión arterial de dióxido de carbono
PAD : presión arterial diastólica
PAM : presión arterial media
PaO₂ : presión arterial de oxígeno

PAS:	presión arterial sistólica
PDA:	cis- 2,3-piperidinedicarboxílico
PERG(s):	electrorretinograma(s) a patrón
PEV:	potenciales evocados visuales
PhNR:	respuesta fotópica negativa
PIO:	presión intraocular
PRP:	potencial de recepción precoz
SD:	desviación estándar
SF:	single flash
SpO₂:	saturación parcial de oxígeno
STR:	respuesta de umbral escotópico
T^a:	temperatura
TC:	tiempo de culminación
Td:	Troland
TL:	<i>tapetum lucidum</i>
TTX:	tetradoxin
μm:	micrómetros
μV:	microvoltios
VI:	valor inicial

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDO:

AGRADECIMIENTOS:	XI
ABREVIATURAS:	XVII
ÍNDICE DE CONTENIDO:	XXIII
ÍNDICE DE FIGURAS:	XXIX
ÍNDICE DE TABLAS:	XXXV
ÍNDICE DE GRÁFICOS:	XXXVII
I.- INTRODUCCIÓN:	3
II.- OBJETIVOS.-	9
III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.-	13
I- LA RETINA:	13
1.1.- DESARROLLO EMBRIOLÓGICO:	13
1.2.- ESTRUCTURA GENERAL:	13
1.3.- DIVISIÓN FUNCIONAL:	15
1.3.1.- CAPA PRE-RECEPTORA:	15
1.3.1.1.- EPITELIO PIGMENTARIO (EPR):	15
1.3.1.2.- TAPETUM LUCIDUM (TL):	17
1.3.2.- CAPA RECEPTORA:	18
1.3.2.1.- ESTRUCTURA:	18
1.3.2.2.- DISTRIBUCIÓN:	21
1.3.2.3.- TERMINACIONES SINÁPTICAS:	21
1.3.2.4.- FOTOTRANSDUCCIÓN:	22
1.3.2.4.1.- FASE DE EXCITACIÓN:	23
1.3.2.4.2.- FASE DE RECUPERACIÓN:	25
1.3.2.5.- ADAPTACIÓN A DISTINTOS NIVELES LUMINOSOS:	27
1.3.3.- CAPA POST-RECEPTORA:	28
1.3.3.1.- CÉLULAS BIPOLARES:	28
1.3.3.1.1.- TIPOS:	28
1.3.3.1.2.- RECEPTORES:	29
1.3.3.1.1.1.- Metabotrópicos:	29
1.3.3.1.1.1.- Ionotrópicos:	30
1.3.3.2.- CÉLULAS DE ASOCIACIÓN:	30
1.3.3.2.1.- CÉLULAS HORIZONTALES:	30
1.3.3.2.2.- CÉLULAS AMACRINAS:	31
1.3.3.2.3.- CÉLULAS INTERPLEXIFORMES:	32
1.3.3.3.- CÉLULAS DE SOSTÉN:	33
1.3.4.-CAPA DE LA CONDUCCIÓN:	33
1.4.- VASCULARIZACIÓN:	34
2.- ELECTROFISIOLOGÍA OCULAR:	35
2.1.- POTENCIAL DE REPOSO DE LA RETINA:	36
2.1.1.- ELECTRO-OCULOGRAMA (EOG):	36
2.1.1.1.- ORIGEN DE LAS ONDAS:	36
2.1.1.2.- CARACTERÍSTICAS:	37
2.2.- POTENCIALES DE ACCIÓN DE LA RETINA:	39
2.2.1.- EL ELECTRORETINOGRAMA (ERG):	39
2.2.1.1.- HISTORIA:	39

2.2.1.2.- BASES ELÉCTRICAS:	40
2.2.1.3.- ORIGEN DE LAS PRINCIPALES ONDAS:	44
2.2.1.3.1.- ONDA c:	46
2.2.1.3.2.- ONDA a:	47
2.2.1.3.3.- ONDA b:	49
2.2.1.4.- COMPONENTES MENORES DEL ERG:	53
2.2.1.4.1.- POTENCIALES OSCILATORIOS (OPs):	53
2.2.1.4.2.- ONDA d:	54
2.2.1.4.3.- RESPUESTA DE UMBRAL ESCOTÓPICO (STR):	55
2.2.1.4.4.- ONDA i:	56
2.2.1.4.5.- RESPUESTA FOTÓPICA NEGATIVA (PhNR):	58
2.2.1.4.6.- POTENCIAL DE RECEPCIÓN PRECOZ (PRP):	59
2.2.1.4.- PRUEBAS ESPECIALES Y MODALIDADES DEL ERG:	60
2.2.1.4.1.- ERG FOTÓPICO:	61
2.2.1.4.1.1.- ERG flicker, definición y origen:	61
2.2.1.4.1.2.- Curvas de luminancia-respuesta, definición y origen:	69
2.2.1.4.2.- ERG ESCOTÓPICO:	73
2.2.1.4.2.1.- AERG:	74
2.2.1.4.2.2.- Curvas de luminancia-respuesta:	75
2.2.1.5.-ANÁLISIS DEL ERG:	77
2.2.1.6.- USO CLINICO DE LA ELECTRORETINOGRFÍA:	78
2.2.1.7.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO ELECTRORETINOGRFICO:	80
2.2.2.- ELECTRORETINOGRAMA FOCAL (fERG) Y MULTIFOCAL (mfERG):	81
2.2.3.- ERG A PATRÓN (PERG):	82
2.3.- POTENCIALES EVOCADOS VISUALES (PEV):	83
3.- FACTORES QUE AFECTAN AL REGISTRO DEL ERG:	83
3.1.- FACTORES CONTROLABLES:	83
3.1.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA ESTIMULACIÓN LUMINOSA:	83
3.1.1.1.- LONGITUD DE ONDA DEL ESTÍMULO:	85
3.1.1.2.- NIVEL ENERGÉTICO DEL ESTÍMULO:	86
3.1.1.3.- FRECUENCIA TEMPORAL DEL ESTÍMULO:	87
3.1.1.4.- DURACIÓN DEL ESTÍMULO:	88
3.1.1.5.- TIPO DE FOTO-ESTIMULADORES:	88
3.1.1.6.- LUMINANCIA DEL AMBIENTE:	89
3.1.2.- DILATACIÓN PUPILAR:	89
3.1.3.- PROTOCOLOS:	90
3.1.4.- RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LA SEÑAL:	91
3.1.4.1.- GENERADORES DE LA SEÑAL:	91
3.1.4.1.1.- GENERADORES ANALÓGICOS:	91
3.1.4.1.2.- GENERADORES DIGITALES:	91
3.1.4.2.- CAPTORES DE LA SEÑAL:	92
3.1.4.2.1.- ELECTRODOS ACTIVOS:	92
3.1.4.2.2.- ELECTRODOS DE REFERENCIA Y DE MASA:	94
3.1.4.3.- TRATAMIENTO DE LA SEÑAL:	95
3.1.4.4.- FUENTES DE RUIDO:	97
3.1.5.- RITMOS CIRCADIANOS:	98
3.1.6.- ANESTESIA:	98
3.1.6.1.- AGENTES VOLÁTILES:	99
3.1.6.1.1.- EFECTOS SOBRE EL ERG:	100
3.1.6.1.2.- MECANISMO DE ACCIÓN:	100
3.1.6.2.- PROPOFOL:	101
3.1.6.3.- BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES:	102
3.1.7.- PRESIÓN SANGUÍNEA DE GASES:	102
3.1.7.1.- PRESIÓN ARTERIAL DE OXÍGENO (Pa O ₂):	103
3.1.7.2.- PRESIÓN ARTERIAL DE DIÓXIDO DE CARBONO (PaCO ₂):	104
3.1.8.- PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (PAM):	106
3.2.- FACTORES NO CONTROLABLES:	107

3.2.1.- DIFERENCIAS ANATÓMICAS:	107
3.2.2.- FACTORES INDIVIDUALES:	107
3.2.3.- EDAD:	107
3.2.4.- FACTORES ENDÓGENOS:	108
3.2.5.- PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO):	108
IV.-MATERIAL Y MÉTODOS.-	113
1.- MATERIAL:	113
1.1.- ANIMALES:	113
1.2.- MATERIAL DE ANESTESIA:	113
1.2.1.- EQUIPAMIENTO ANESTÉSICO:	113
1.2.2.- FÁRMACOS ANESTÉSICOS:	114
1.2.3.- OTROS FÁRMACOS:	114
1.2.4.- MATERIAL DE MONITORIZACIÓN:	114
1.2.4.1.- MONITORIZACIÓN RESPIRATORIA Y DE GASES:	114
1.2.4.2.- MONITORIZACIÓN CARDIOVASCULAR Y TERMOMETRÍA:	114
1.3.- MATERIAL AUXILIAR:	115
1.4.- MATERIAL DE ESTIMULACIÓN Y DE REGISTRO:	115
1.4.1.-FOTOESTIMULADORES:	115
1.4.2.- AMPLIFICADOR:	116
1.4.3.- UNIDAD DE PROCESADO Y DE RECOGIDA DE DATOS:	116
1.4.3.1.- ELECTRODOS:	116
1.4.3.1.1.- ACTIVOS:	116
1.4.3.1.2.- REFERENCIA Y MASA:	117
1.4.3.2.- BASE INFORMÁTICA:	117
2.- MÉTODOS:	118
2.1.- GRUPOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL:	118
2.2.- PROTOCOLO ANESTÉSICO:	120
2.2.1.- DESARROLLO:	120
2.2.2.- MEDICIONES:	120
2.3.- ESTUDIO ELECTORRETINOGRÁFICO:	121
2.3.1.- DESARROLLO:	121
2.3.2.- PROTOCOLO:	122
2.3.2.1.- PRIMERA PARTE; FOTÓPICA:	123
2.3.2.1.1.- FUNCIÓN LUMINANCIA-RESPUESTA ("PHOTOPIC HILL"):	123
2.3.2.1.2.- FLICKER:	124
2.3.2.2.- SEGUNDA PARTE; ESCOTÓPICA:	124
2.3.2.3.- TERCERA PARTE; FOTÓPICA:	124
2.3.3.- MEDICIÓN DE LAS ONDAS:	125
2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	127
2.4.1.- DATOS ELECTORRETINOGRÁFICOS Y DIÁMETRO PUPILAR:	127
2.4.2.- PARÁMETROS CARDIOVASCULARES, RECUPERACIÓN ANESTÉSICA Y TEMPERATURA (Tª):	128
2.4.3.- PARÁMETROS RESPIRATORIOS:	128
V.- RESULTADOS:	131
1.- RESULTADOS ELECTRORETINOGRÁFICOS:	131
1.1.- ANÁLISIS CUANTITATIVO:	131
1.1.1.- PRIMERA PARTE; FOTÓPICA:	131
1.1.1.1.- FUNCIÓN LUMINANCIA-RESPUESTA ("PHOTOPIC HILL"):	131
1.1.1.1.1.- I _{max} (log cd.s.m-2):	132
1.1.1.1.1.1.- Valores:	132

1.1.1.1.1.2.- Comparativa de los 4 grupos:	132
1.1.1.1.2.- AMPLITUD DE LA ONDA b (μV) EN EL Imax (V_{max}) Y SU TC (ms):	132
1.1.1.1.2.1.- Valores:	132
1.1.1.1.2.2.- Comparativa de los 4 grupos:	132
1.1.1.1.3.- AMPLITUD EN VALOR ABSOLUTO (μV) Y TC (ms) DE LA ONDA a EN Imax (Amax):	133
1.1.1.1.3.1.- Valores:	133
1.1.1.1.3.2.- Comparativa de los 4 grupos:	133
1.1.1.1.4.- RELACIÓN b/a EN Imax:	134
1.1.1.1.4.1.- Valores:	134
1.1.1.1.4.2.- Comparativa de los 4 grupos:	134
1.1.1.1.5.- K ($\log \text{ cd.s.m}^{-2}$):	135
1.1.1.1.5.1.- Valores:	135
1.1.1.1.5.2.- Comparativa de los 4 grupos:	135
1.1.1.1.6.- Amplitud en valor absoluto (μV) y TC (ms) de la respuesta negativa posterior a la onda b; PhNR:	136
1.1.1.1.6.1.- Valores:	136
1.1.1.1.6.2.- Comparativa de los 4 grupos:	137
1.1.1.1.7.- AMPLITUD (μV) Y TC (ms) DE LA Onda i:	137
1.1.1.1.7.1.- Valores:	137
1.1.1.1.7.2.- Comparación entre los 4 grupos:	137
1.1.1.1.8.- POTENCIALES OSCILATORIOS; OPs:	138
1.1.1.1.8.1.- Amplitud (μV) OP2:	138
1.1.1.1.8.2.- Amplitud (μV) OP3:	138
1.1.1.1.8.3.- Amplitud (μV) OP4:	138
1.1.1.1.8.4.- Sumatorio de OPs (μV):	138
1.1.1.1.8.5.- TC (ms) Del OP2:	138
1.1.1.1.8.6.- TC (ms) Del OP3:	139
1.1.1.1.8.7.- TC (ms) Del OP4:	139
1.1.1.1.8.8.- Comparativa de los 4 grupos:	139
1.1.1.1.9.- PRIMER FLICKER:	140
1.1.1.1.9.1.- Amplitud (μV) del flicker 6 Hz:	140
1.1.1.1.9.2.- Amplitud (μV) del flicker 12 Hz:	140
1.1.1.1.9.3.- Amplitud (μV) del flicker 20 Hz:	140
1.1.1.1.9.4.- Amplitud (μV) y TC (ms) del flicker 30 Hz:	141
1.1.1.1.9.5.- Comparativa de los 4 grupos:	141
1.1.2.- SEGUNDA PARTE; ESCOTÓPICA:	143
1.1.2.1.- ADAPTO-ELECTRORRETINOGRAMA (AERG):	143
1.1.2.1.1.- ISON:	143
1.1.2.1.1.1.- Amplitud (μV):	143
1.1.2.1.1.2.- TC (ms):	144
1.1.2.1.2.- ISOH:	144
1.1.2.1.2.1.- Amplitud (μV):	144
1.1.2.1.2.2.- TC (ms):	144
1.1.2.1.3.- SEVON:	144
1.1.2.1.3.1.- Amplitud (μV):	144
1.1.2.1.3.2.- TC (ms):	145
1.1.2.1.4.- SEVOH:	145
1.1.2.1.4.1.- Amplitud (μV):	145
1.1.2.1.4.2.- TC (ms):	145
1.1.2.1.5.- COMPARATIVA DE LA AMPLITUD Y DEL TC DELA ONDA b EN T32 ENTRE LOS 4 GRUPOS:	145
1.1.2.2.- SINGLE FLASH (SF):	147
1.1.2.2.1.- AMPLITUD (μV) EN VALOR ABSOLUTO DE LA ONDA a:	147
1.1.2.2.2.- TC (ms) DE LA ONDA a:	147
1.1.2.2.3.- AMPLITUD (μV) DE LA ONDA b:	147
1.1.2.2.3.- TC (ms) DE LA ONDA b:	148
1.1.2.2.4.- RELACIÓN b/a:	148
1.1.2.2.5.- COMPARATIVA DE LOS 4 GRUPOS:	148

1.1.3.- TERCERA PARTE; FOTÓPICA:	149
1.1.3.1.- SEGUNDO FLICKER:	149
1.1.3.1.1.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 6 HZ:	149
1.1.3.1.2.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 12 HZ:	149
1.1.3.1.3.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 20 HZ:	149
1.1.3.1.4.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 30 HZ:	149
1.1.3.2.- TERCER FLICKER:	150
1.1.3.2.1.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 6 HZ:	150
1.1.3.2.2.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 12 HZ:	150
1.1.3.2.3.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 20 HZ:	150
1.1.3.2.4.- AMPLITUD (μ V) DEL FLICKER 30 HZ:	150
1.1.3.2.5.- COMPARATIVA ENTRE LA AMPLITUD DEL SEGUNDO Y TERCER FLICKER EN LOS 4 GRUPOS:	151
1.2.- ANÁLISIS CUALITATIVO:	152
1.2.1.- ONDA a:	152
1.2.2.- ONDA b:	153
1.2.3.- ONDA i:	156
1.2.4.- OPs:	157
1.2.5.- RESPUESTA NEGATIVA TRAS LA ONDA b (PhNR):	157
1.2.6.- FLICKER:	157
1.2.7.- ADAPTO-ELECTRORRETINOGRAMA (AERG):	158
1.2.8.- SINGLE FLASH (SF):	160
2.- DILATACIÓN PUPILAR:	160
2.1.- DIÁMETRO PUPILAR (mm) AL INICIO:	160
2.2.- DIÁMETRO PUPILAR (mm) AL FINAL:	161
2.3.- DIFERENCIAS ENTRE LOS 4 GRUPOS:	161
3.- RESULTADOS ANESTÉSICOS:	162
3.1.- PARÁMETROS CARDIOVASCULARES Y TEMPERATURA:	162
3.1.1.- PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (mmHg) (PAM):	162
3.1.1.1.- ISON:	162
3.1.1.2.- ISOH:	163
3.1.1.3.- SEVON:	163
3.1.1.4.- SEVOH:	163
3.1.2.- FRECUENCIA CARDÍACA EN (latidos/minuto) (FC):	164
3.1.2.1.- ISON:	164
3.1.2.2.- ISOH:	164
3.1.2.3.- SEVON:	165
3.1.2.4.- SEVOH:	165
3.1.3.- TEMPERATURA (C°) (Tª):	166
3.1.3.1.- ISON:	166
3.1.3.2.- ISOH:	166
3.1.3.3.- SEVON:	167
3.1.3.4.- SEVOH:	167
3.1.4.- COMPARATIVA DE LOS CUATRO GRUPOS:	168
3.5.- TIEMPO DE RECUPERACIÓN EN MINUTOS:	170
3.5.1.- TIEMPO DE EXTUBACIÓN:	170
3.5.2.- TIEMPO DE POSICIÓN EN DECÚBITO ESTERNAL:	171
3.5.3.- TIEMPO DE DEAMBULACIÓN:	171
3.5.4.- TIEMPO TOTAL DE RECUPERACIÓN:	171
3.5.5.- COMPARATIVA DE LOS 4 GRUPOS:	171
VI.- DISCUSIÓN:	175
1.- ESTUDIO ELECTRORRETINOGRÁFICO:	175

1.1.- ERG FOTÓPICO:	175
1.1.1.- ONDA a:	175
1.1.2.- ONDA b:	176
1.1.3.- ERG FLICKER:	177
1.1.4.- RESPUESTA NEGATIVA POSTERIOR A LA ONDA b (PhNR):	181
1.1.5.- ONDA i:	182
1.1.6.- OPs:	182
1.1.7.- ERG Y ANESTESIA:	183
1.1.8.- ERG E HIPERCAPNIA:	185
1.1.9.- ERG Y OTROS FACTORES DE VARIACIÓN:	187
1.1.9.1.- PaO ₂ :	187
1.1.9.2.- PAM:	188
1.1.9.3.- PIO:	188
1.2.- ERG ESCOTÓPICO:	189
1.2.1.- ADAPTO- ELECTORRETINOGRAMA (AERG):	189
1.2.2.- SINGLE FLASH (SF):	191
1.1.7.- EFECTO DE ADAPTACIÓN A LA LUZ:	191
2.- ESTUDIO ANESTÉSICO:	193
VII.- CONCLUSIONES:	197
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.-	201
IX.- RESÚMENES.-	229
1.- RESUMEN:	229
2.- SUMMARY:	231

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Esquema de las diferentes capas de la retina y de las células que la componen (adaptado de: Kolb, 2003).	15
Figura 2: Modelo de transporte iónico en las membranas basal y apical del EPR bovino (Joseph y Miller, 1991)	17
Figura 3: Fondo de ojo del perro, en el que se aprecia el TL (zona brillante superior).	18
Figura 4: Estructura básica de los FR (izquierda) y del segmento externo de los conos y de los bastones (derecha) (adaptado de: Young, 1971).	19
Figura 5: Curvas de probabilidad de absorción espectral de los bastones y de los diferentes tipos de conos del perro según Neitz et al.	20
Figura 6: Segmento externo de un bastón y de las moléculas de rodopsina incluidas en la membrana plasmática de sus discos (Kolb, 2003).	20
Figura 7: Intercambio de iones en los segmentos externos de los FR que contribuyen a mantener la corriente oscura (izquierda). Con la exposición a la luz se cierran los canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependientes de GMP_c (derecha) (Yau, 1994).	23
Figura 8: Paso de 11-cis-retinal a todo-trans-retinal por acción de la luz.	24
Figura 9: Liberación de glutamato por parte de los FR en oscuridad y por acción de la luz (Yau, 1994).	25
Figura 10: Diagrama que representa los mecanismos de activación e inactivación en los FR de los vertebrados (Fain et al., 2001).	26
Figura 11: Esquema de los distintos tipos de células bipolares (ON y OFF) y su reacción ante la tasa de glutamato liberado por los FR estimulados por la luz. Las bipolares ON (a y b) tienen receptores de glutamato inhibidores, y las bipolares OFF (c) tienen receptores de glutamato excitadores (Kolb, 2003).	29
Figura 12: Distinto tipo de células horizontales y su conexión con los conos y los bastones. Los conos M, L y S se representan en color verde, rojo y azul respectivamente.	31
Figura 13: Las células horizontales recogen información de un amplio rango de conos, y ejercen su influencia sobre las bipolares directamente y/o por mecanismos de feed-back hacia los conos (Kolb, 2003).	31
Figura 14: Los bastones utilizan las vías OFF a través de células amacrinas de tipo AII (Kolb, 2003).	32
Figura 15: Ejemplo de EOG: cociente de Arden $((\text{LP}/\text{DT}) \times 100) = 238$ (Mora y Aregall, 2005).	38
Figura 16: Descomposición del ERG en tres componentes: PI, PII y PIII (Granit, 1933).	40
Figura 17: Rutas local (A) y remota (B) que siguen las corrientes extracelulares generadas en la retina.	41
Figura 18: Resistencias eléctricas de los distintos tejidos oculares. C y D representan los puntos de localización de electrodos para registrar el ERG extrarretinal.	42

Figura 19: Forma básica del ERG, con sus ondas a y b. La flecha roja representa el inicio del estímulo. ____	45
Figura 20: ERGs registrados sobre retinas enteras (A), desprovistas de EPR (B) y retinas tratadas con aspartato (C) (adaptado de Pepperberg et al., 1978). _____	46
Figura 21: ERG obtenido en condiciones normales (trazado inferior) y tras aplicar PDA (trazado superior). Con PDA desaparece la onda a y aumenta la amplitud de la onda b (Bush y Sieving, 1996). _____	48
Figura 22: Onda a del ERG obtenida con distintas intensidades de estímulo en condiciones normales, y tras tratar la retina con APB o con la combinación de APB y PDA. Con estímulos débiles e intermedios, el APB y el PDA eliminan la onda a (Bush y Sieving, 1994). _____	48
Figura 23: Cambios inducidos por la luz en la concentración extracelular de K^+ (ΔV_K), en las distintas capas de la retina (Karwoski et al., 1985). _____	50
Figura 24: Corrientes extracelulares de K^+ (inducidas por la luz), implicadas en la formación de la onda b del ERG, según la hipótesis de las células de Müller (Newman, 1980). _____	51
Figura 25: ERGs obtenidos en condiciones normales (columna de la izquierda), y tras aplicar TTX y NMDA (columna de la derecha). La combinación de TTX y NMDA no modifica apenas la morfología de las ondas a y b, e incrementa ligeramente la amplitud de la onda i (Ueno et al., 2004). _____	52
Figura 26: OPs mayores (2,3 y 4) en la rama ascendente y descendente de la onda b (trazado superior) y aislados por filtrado numérico (100-300 Hz) de la curva original (trazado inferior). _____	53
Figura 27: ERGs realizados con un estímulo largo (200 ms) en el que se aprecia la onda d (a), y con un estímulo corto (15 ms) en el que no se aprecia por que se combina con la b (b) (Bush y Sieving, 1996). ____	55
Figura 28: Series de ERGs realizados con intensidades de estímulo crecientes. En los estímulos más bajos se aprecia el STR (Wakabayashi et al., 1988). _____	56
Figura 29: Onda i registrada en los ERGs de distintas especies. En la rata y en el ratón no se aprecia o es muy pequeña (Rosolen et al., 2004b). _____	58
Figura 30: ERGs de un paciente sano (columna izquierda) y de otro con glaucoma primario de ángulo abierto (POAG; columna derecha). El ERG del paciente con POAG carece de PhNR (Viswanathan et al., 2001). _	58
Figura 31: ERP humano con una onda positiva (R1) y otra más lenta y negativa (R2) (Benítez del Castillo et al., 2002). _____	60
Figura 32: ERGs obtenidos antes y después de aplicar glicina en el vítreo (Creel et al., 1987). _____	62
Figura 33: ERG Flicker del mono realizado a distintas frecuencias de estimulación (4-64 Hz), antes (columna de la izquierda) y después de aplicar APB (columna del medio), o la mezcla de APB y PDA (columna de la derecha) (Kondo y Sieving, 2001). _____	63
Figura 34: Representación vectorial de los distintos componentes del ERG flicker de 4, 10 y 32 Hz: ON, OFF (vías post-sinápticas; post) y FR (ph). (Kondo y Sieving, 2001). _____	64

Figura 35: Representación vectorial de los componentes que forman el ERG flicker de 32 Hz del mono. El círculo superior se corresponde con una situación normal. El resto de círculos representan situaciones patológicas hipotéticas en las que existe un retraso del componente ON (A), retraso del OFF (C), reducción del componente ON (B) o reducción del OFF (D) (Kondo y Sieving, 2001).	65
Figura 36: Descomposición de una onda sinusoidal compleja (gráfico superior) en su componente fundamental y sucesivos armónicos (gráfico inferior), mediante el análisis de Fourier (Bach y Meigen, 1999).	66
Figura 37: Representación vectorial de los distintos componentes que forman el ERG flicker de 32 Hz, en respuesta a estímulos sinusoidales (círculo de la izquierda) o a estímulos con flash estroboscópico (Kondo y Sieving, 2002).	67
Figura 38: Amplitud del componente fundamental y sucesivos armónicos en el flicker de 32 Hz evocado por estímulos sinusoidales (arriba) o por flashes estroboscópicos (abajo) (Kondo y Sieving, 2002).	67
Figura 39: Componentes fundamental y sucesivos armónicos del ERG flicker de 32 Hz evocado con estímulos sinusoidales (izquierda) o con flashes estroboscópicos (izquierda), antes (control) y después de aplicar APB, o la mezcla de APB y PDA (Kondo y Sieving, 2002).	68
Figura 40: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas ("photopic hill") del hombre (línea punteada) y del mono (línea continua). El eje de abscisas representa la amplitud de la onda b y el de coordenadas la intensidad del estímulo (Ueno et al., 2004).	69
Figura 41: Descriptores para analizar el "photopic hill" (Rufiange et al., 2005).	70
Figura 42: "Photopic hill" del hombre en dos ambientes luminosos diferentes: 30 cd.m ⁻² (trazado punteado) y 17 cd.m ⁻² (trazado continuo) (Rufiange et al., 2003).	71
Figura 43: Curvas de luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz ("photopic hill") del perro: trazados de ERG (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas a y b con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) (Rosolen et al., 2005d).	71
Figura 44: Series de ERGs realizadas con intensidades de estímulo crecientes, resultado de inyectar en el vítreo APB (columna izquierda), PDA (columna central) o la mezcla de APB y PDA (columna de la derecha). En cada columna el trazado gris representa el ERG control (ojo sin tratar) (Ueno et al., 2004).	73
Figura 45: AERG del perro realizado en los tiempos (minutos) 0 (T0), 2 (T2), 4 (T4), 8 (T8), 16 (T16) y 32 (T32) de adaptación a la oscuridad (Rosolen et al., 2005d).	75
Figura 46: Curvas de luminancia-respuesta en condiciones escotópicas y con la retina adaptada a la oscuridad de una especie nocturna (rata). Trazados de ERG (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas a y b con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) (Rosolen et al., 2005d).	76
Figura 47: Forma básica del ERG y manera de medir las principales ondas (a y b). La flecha roja representa el inicio del estímulo, las flechas azules los TC (ms) y las negras las amplitudes (μV).	77
Figura 48; Trazado típico del PERG (Bach et al., 2000).	82

Figura 49: Curvas de eficacia luminosa del sistema fotópico (línea naranja) y del escotópico (línea azul) del hombre (Gouras, 1984).	86
Figura 50: Respuestas de los conos y de los bastones a un estímulo breve de luminancia variable. En ambiente fotópico, los bastones responden en modo saturación (adaptado de Lazard et al., 2000).	87
Figura 51: Tipo de fotoestimuladores: binoculares independientes (izquierda) y Ganzfeld (derecha).	88
Figura 52: Protocolo electrorretinográfico para especies diurnas (Rosolen et al., 2005d).	90
Figura 53: Protocolo electrorretinográfico para especies nocturnas (Rosolen et al., 2005d).	91
Figura 54: Electrodo corneales de tipo Allen- Burian (izquierda) y de tipo ERG-jet (derecha).	93
Figura 55: Electrodo gold-foil de Arden.	93
Figura 56: Electrodo DTL (izquierda) y manera de colocarlo (derecha).	93
Figura 57: Electrodo conjuntivo-escleral (derecha) y colocación en la conjuntiva escleral cerca del limbo.	94
Figura 58: Electrodo de referencia y de masa utilizados en el hombre (derecha) y en los animales (izquierda).	94
Figura 59: Operación de lisado, que consiste en descomponer una senoide compleja en varias sinusoides sencillas utilizando la transformada de Fourier (A). Filtrado de la señal inicial de 0-300 Hz a 100-300 Hz para extraer los OPs (B).	96
Figura 60: ERG recogido en un perro con sedación insuficiente. La señal está muy contaminada debido a la actividad muscular (flechas) (Komaromy et al., 2002).	97
Figura 61: Fondo de ojo de uno de los animales utilizado en el experimento, zona tapetal (izquierda) y zona no tapetal (derecha).	113
Figura 62: Fotoestimulador de tipo binocular, con ranuras para la interposición de filtros.	116
Figura 63: Electrodo de tipo esclero-conjuntival (izquierda), utilizado como activo, y de tipo aguja de acupuntura (derecha), utilizado como referencia y masa.	117
Figura 64: Ventana de selección de parámetros de estimulación, de recogida, así como de tipo de examen.	117
Figura 65: Ventana de análisis y tratamiento de las curvas obtenidas.	118
Figura 66: Posición de los electrodos activos y de referencia, así como de la cabeza del animal previo al inicio del examen electrorretinográfico.	119
Figura 67: Posición de los fotoestimuladores durante el examen electrorretinográfico.	121
Figura 68: Colocación del electrodo activo en la conjuntiva bulbar y del de referencia a nivel del canto temporal (derecha).	122
Figura 69: Esquema del protocolo electrorretinográfico utilizado, con una primera parte fotópica, una segunda parte escotópica y una tercera parte de nuevo fotópica (adaptado de Rosolen et al., 2005).	122

- Figura 70: ERG del perro en el que se aprecian las distintas ondas que lo componen. Para una onda determinada, las flechas azules representan los TC y las verdes la amplitud. _____ 125
- Figura 71: Ejemplo de flicker ERG de 30 Hz y manera de medir la amplitud de pico a pico (líneas rojas) y el TC (flecha azul). La flecha roja representa el inicio del flash. _____ 126
- Figura 72: Función luminancia-respuesta (“photopic hill”) del perro (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas a y b en función de la intensidad del estímulo, así como extracción de I_{max} , V_{max} , A_{max} y K (derecha). _____ 126
- Figura 73: Extracción de los OPs (trazado inferior) por filtrado(100-300 Hz) de la curva original (trazado superior) para su posterior análisis. _____ 127
- Figura 74: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo ISON (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas a y b con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo. _____ 154
- Figura 75: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo ISOH (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas a y b con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo. _____ 155
- Figura 76: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo SEVON (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas a y b con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo. _____ 155
- Figura 77: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo SEVOH (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas a y b con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo. _____ 156
- Figura 78: ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de la onda i, en nuestro experimento. La flecha roja indica el inicio del flash. _____ 156
- Figura 79: ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de los OPs de nuestro experimento (trazado inferior) tras ser extraídos de la curva original (trazado superior), la flecha roja indica el inicio del flash. _____ 157
- Figura 80: ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de la PhNR, en nuestro experimento. La flecha roja indica el inicio del flash. _____ 157
- Figura 81: Flicker ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de las ondas para cada una de las frecuencias estudiadas en nuestro experimento, la flecha roja indica el inicio del flash. _____ 158

Figura 82: AERG representativo de los grupos normocápnicos (ISON y SEVON) de nuestro experimento, en el que se aprecia la morfología del ERG escotópico durante 32 minutos de adaptación a la oscuridad. En algún animal apareció una pequeña onda a en el minuto 32 y/o 16 (izquierda). La flecha roja indica el inicio del flash. _____ 159

Figura 83: AERG representativo de los grupos hipercápnicos (ISOH y SEVOH) de nuestro experimento, en el que se aprecia la morfología del ERG escotópico durante 32 minutos de adaptación a la oscuridad. La flecha roja indica el inicio del flash. _____ 159

Figura 84: ERG fotópico representativo de nuestro experimento, en el que se aprecia la morfología de la PhNR, (trazado inferior). ERG escotópico en T32 del AERG en el que se aprecia una negatividad posterior a la onda b, más tardía que la PhNR (trazado superior). La flecha roja indica el inicio del flash. _____ 160

Figura 85: SF representativo de nuestro experimento. La flecha roja indica el inicio del flash. _____ 160

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Afecciones retinianas comunes en distintas razas de perro (adaptado de: Narfström y Ekesten, 1999).	80
Tabla 2: Factores de conversión de luminancias (Brigell et al., 1988).	84
Tabla 3: Amplitud y TC de las ondas a y b en I _{max} (A _{max} y V _{max}), así como I _{max} . Para cada parámetro, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).	134
Tabla 4: Relación b/a y K. Para cada parámetro, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).	136
Tabla 5: Amplitud y TC de la onda i y de la PhNR. No hubo diferencias significativas entre grupos.	137
Tabla 6: Amplitud de los OPs 2, 3 y 4, así como el sumatorio (Σ OPs) y la relación de cada uno de ellos con el total. No hubo diferencias significativas entre grupos.	139
Tabla 7: Amplitud de los OPs 2, 3 y 4, así como el sumatorio (Σ OPs) y la relación de cada uno de ellos con el total. No hubo diferencias significativas entre grupos.	140
Tabla 8: TC de los OPs 2, 3 y 4. No hubo diferencias significativas entre grupos.	140
Tabla 9: Amplitud del primer flicker en las 4 frecuencias realizadas (6, 12, 20 y 30). Para cada frecuencia, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).	143
Tabla 10: Amplitud de la onda b durante el AERG (t ₀ , t ₂ , t ₄ , t ₈ , t ₁₆ y t ₃₂). En t ₃₂ , para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).	146
Tabla 11: TC de la onda b durante el AERG (t ₀ , t ₂ , t ₄ , t ₈ , t ₁₆ y t ₃₂). No hubo diferencias significativas entre grupos en t ₃₂ .	147
Tabla 12: Amplitud y TC de las ondas a y b, así como la relación b/a del SF. No hubo diferencias significativas entre grupos.	148
Tabla 13: Amplitud del segundo (2º F) y tercer flicker (3er F) en las 4 frecuencias realizadas (6, 12, 20 y 30 Hz) representada con la media \pm SD. Para cada frecuencia y dentro de cada grupo, los * representan diferencia estadística entre el segundo y el tercer flicker ($p < 0,05$).	152
Tabla 14: Dilatación pupilar al inicio y al final del experimento, representada con la media \pm SD. Las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).	162
Tabla 15: PAM. Los valores se representan con su media \pm SD. Para un mismo grupo los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos.	168
Tabla 16: PAM. Los valores se representan con su media \pm SD. Para un mismo grupo los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos.	169

Tabla 17: FC. Los valores se representan con su media \pm SD. Para un mismo grupo, los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos. _____ 169

Tabla 18: T^a. Los valores se representan con su media \pm SD. Para un mismo grupo, los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos. _____ 170

Tabla 19: Tiempos de recuperación anestésica. Para cada parámetro, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____ 172

ÍNDICE DE GRÁFICOS:

Gráfico 1: Amax y Vmax representados con la media \pm SD. Para cada onda, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____	133
Gráfico 2: Relación b/a en Imax, representada con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____	135
Gráfico 3: K representada con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____	136
Gráfico 4: Amplitud del primer flicker en las 4 frecuencias realizadas (6, 12, 20 y 30 Hz), representada con la media \pm SD. Para cada frecuencia, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____	142
Gráfico 5: TC del primer flicker de 30 Hz, representado con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____	142
Gráfico 6: Amplitud de la onda b durante el AERG (t0, t2, t4, t8, t16 y t32). Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD (ver tabla 9) para facilitar la visualización de las curvas. En t32, para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____	146
Gráfico 7: Amplitud del segundo (2º F) y tercer flicker (3er F) en las 4 frecuencias realizadas (6, 12, 20 y 30 Hz) representada con la media \pm SD. Para cada frecuencia y dentro de cada grupo, los * representan diferencia estadística entre el segundo y el tercer flicker ($p < 0,05$). _____	151
Gráfico 8: Amplitud de la onda a durante el “photopic hill”. Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD (ver figuras 74-77) para facilitar la visualización de las curvas. _____	153
Gráfico 9: TC de la onda a durante el “photopic hill”. Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD para facilitar la visualización de las curvas. La línea punteada representa la intensidad de estímulo necesaria para la cual la amplitud de la onda a fue de 10 ms. _____	153
Gráfico 10: Amplitud de la onda b durante el “photopic hill”. Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD (ver figuras 74-77) para facilitar la visualización de las curvas. _____	154
Gráfico 11: Dilatación pupilar al inicio y al final del experimento, representada con la media \pm SD. Las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). _____	161
Gráfico 12: PAM del grupo ISON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). _____	162
Gráfico 13: PAM del grupo ISOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). _____	163
Gráfico 14: PAM del grupo SEVON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). _____	163

Gráfico 15: PAM del grupo SEVOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	164
Gráfico 16: FC del grupo ISON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	164
Gráfico 17: FC del grupo ISOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	165
Gráfico 18: FC del grupo SEVON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	165
Gráfico 19: FC del grupo SEVOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	166
Gráfico 20: Tª del grupo ISON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	166
Gráfico 21: Tª del grupo ISOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	167
Gráfico 22: Tª del grupo SEVON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	167
Gráfico 23: Tª del grupo SEVOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).	168
Gráfico 24: Tiempo total de recuperación anestésica, representado con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).	172

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN:

Se puede decir que la electrofisiología ocular nació en 1849 cuando Dubois-Reymond descubrió el dipolo córneo-retiniano y desde entonces no ha parado de evolucionar (Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002). Los primeros electrorretinogramas (ERGs) fueron recogidos en ojos de rana por Holmgren en 1865. Pocos años después, Dewar observó que los ojos de rana expuestos a la luz provocaban ligeros movimientos en la aguja de un galvanómetro, sugiriendo que existía un cambio eléctrico positivo de la córnea con respecto al fondo del ojo (De Rouck, 1991). En 1933, Ragnar Granit publicó un estudio más detallado sobre el ERG del gato, descomponiéndolo en sus tres componentes fundamentales PI, PII y PIII (Granit, 1933). El análisis de Granit ha sido modificado a lo largo de los años, pero sigue siendo una buena base para la interpretación del ERG (Lazard *et al.*, 2000). Hoy en día el origen celular exacto de alguno de sus componentes sigue siendo objeto de discusión. En lo que respecta a esto último, en los últimos años, se ha adquirido mucha información, en parte gracias al descubrimiento de algunos fármacos que bloquean selectivamente la respuesta de uno u otro grupo celular a nivel de la retina (Green y Kapousta-Bruneau, 1999). De entre esos fármacos destacan el APB y el PDA que bloquean de manera selectiva la respuesta de las vías retinianas ON y OFF respectivamente. Son muy efectivos, aunque su empleo requiere una técnica específica y presentan algunos efectos secundarios (Slaughter y Miller, 1981; 1983a; Xu *et al.*, 1991).

Dentro de las distintas pruebas electrofisiológicas que se pueden realizar, el ERG, objeto de nuestro estudio, es el más utilizado en la práctica veterinaria. Se trata de una técnica diagnóstica que permite registrar los cambios en el potencial eléctrico del ojo cuando es estimulado por la luz (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002). Tales cambios reflejan la actividad de diversas células de la retina incluyendo los fotorreceptores (FR) (conos y bastones). Por ello, es indispensable un buen conocimiento de la anatomía y fisiología de las estructuras responsables de generar las señales eléctricas que el electrofisiólogo estudia. En muchas ocasiones, permite detectar anomalías funcionales de la retina, incluso en ausencia de alteraciones oftalmoscópicas (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002; Rosolen *et al.*, 2005d).

En el caso de los animales, en los cuales la comunicación verbal es lógicamente imposible, el ERG se convierte en una herramienta en ocasiones imprescindible a la hora de evaluar la función visual. En el perro, se usa con fines clínicos, principalmente para evaluar la función retiniana antes de una cirugía de cataratas, para diagnosticar precozmente distrofias retinianas y para distinguir entre varios tipos de cegueras (con origen retiniano o con origen central) (Acland, 1988; Narfström y Ekesten, 1999; Narfström y Wrigstad, 1999; Alexander *et al.*, 2003). Estos registros han servido y

sirven para expandir nuestro conocimiento acerca de la anatomía y de la fisiología del sistema visual, para estudiar la evolución de procesos patológicos del ojo y para evaluar la eficacia de ciertos tratamientos (Cullen y Grahn, 2002; Rosolen *et al.*, 2005d). No obstante, no es ningún secreto que un gran porcentaje de los registros electroretinográficos realizados en animales están dirigidos a mejorar de una manera u otra el bienestar de los pacientes humanos. En este sentido, los animales juegan un papel muy importante, en ocasiones vital, en la investigación oftalmológica, aunque a menudo no sean los beneficiarios directos de dichas investigaciones. Un ejemplo de ello, son los ensayos farmacológicos y toxicológicos, a corto o a largo plazo, de algunas sustancias potencialmente dañinas para la retina (Novack, 1997; Wiebe y Hamilton, 2002; Ponjavic *et al.*, 2004; Rosolen *et al.*, 2005d).

Para la mayoría de los oftalmólogos, las pruebas electrofisiológicas siguen siendo como un jeroglífico egipcio y no es extraño, dada la complejidad de algunos estudios publicados, así como la dificultad de acceso y la poca generalización en el uso de estos tests. Por otra parte el gran número de técnicas y variantes, juntamente con el hecho de que neurólogos, neurofisiólogos y oftalmólogos manejan diferentes aspectos de dichas pruebas han propiciado que no hubiera unos criterios de normalidad claros e universales (Benítez del Castillo *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004, Mora y Aregall, 2005).

En este sentido, en los últimos años, surgió la necesidad de normalizar las técnicas electrodiagnósticos de la función visual, con el fin de aumentar la fiabilidad y reproducibilidad de estas pruebas. En 1989 la ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) elaboró un protocolo estándar de ERG de pleno campo. Dicho protocolo está dirigido a la oftalmología humana y ha sido revisado varias veces. La última versión está disponible desde 2004 (Marmor *et al.*, 2004). En 2002 Narfström *et al.*, hicieron lo propio a través del ECVO (European College of Veterinary Ophthalmologists) para ser aplicado en el perro (Narfström *et al.*, 2002). Se trata de protocolos puramente clínicos. Recientemente han sido publicados unos protocolos de ERG más específicos y complejos destinados a especies animales de experimentación (incluida la canina) y para estudios toxicológicos (Rosolen *et al.*, 2005d).

Para que el ERG sea una herramienta útil, tanto a nivel clínico como experimental, es imprescindible conocer los múltiples factores que afectan tanto a su morfología como a su amplitud y propiedades temporales. De entre los muchos factores que van a modificar el ERG, representan especial importancia los controlables, y en el caso de los animales la anestesia y las condiciones de la misma. (Komaromy *et al.*, 1998, Sloan, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström, 2002; Ofri, 2002; Mora y Aregall, 2005).

El registro de señales eléctricas relacionadas con el sistema visual en el hombre o en el animal no es particularmente doloroso, pero requiere cierto grado de cooperación. En el caso del animal, que

suele estar inquieto y sorprendido ante las manipulaciones llevadas a cabo, dicha cooperación es mínima, por lo tanto el recurso a la anestesia general es inevitable, salvo en contadas excepciones (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002). En el registro de ERGs, la anestesia tiene ciertas ventajas, ya que consigue evitar artefactos producidos por movimientos de los animales, excesiva actividad muscular o estrés (Komaromy *et al.*, 2002). No obstante, es muy importante tener en cuenta el tipo de anestésico utilizado ya que estos tienen en mayor o menor medida efectos sobre los registros electrofisiológicos (Sloan, 1998).

Los agentes volátiles poseen unas características que los hacen adecuados y seguros para ser utilizados en animales, proporcionando una anestesia segura y de buena calidad. Los más empleados en veterinaria son: halotano, isoflurano y sevoflurano. La mayoría de los anestésicos y en particular los volátiles deprimen el centro respiratorio de manera dosis dependiente. En ausencia de ventilación controlada (mecánica o manual), esta depresión da lugar a situaciones de hipoventilación que se ponen de manifiesto con hipoxia e hipercapnia (Steffey, 1996). La hipercapnia tiene importantes efectos sobre el ERG, aunque dichos efectos solo han sido estudiados sobre unos pocos componentes del mismo, en el gato.

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS.-

Tras realizar un amplio recorrido sobre los avances en electrofisiología ocular, echamos de menos trabajos que determinaran los efectos de los diferentes tipos de anestésicos sobre los diferentes componentes del electroretinograma del perro, tanto fotónicos como escotónicos.

De la misma manera no hemos encontrado estudios que reflejen el efecto de ciertas situaciones frecuentes durante la anestesia general, como la hipercapnia, sobre el ERG del perro, siguiendo un protocolo estandarizado.

De entre los protocolos electroretinográficos disponibles en la bibliografía, hemos elegido uno de reciente publicación recomendado para estudios toxicológicos en animales de laboratorio (Rosolen *et al.*, 2005d). Se trata de un protocolo completo que estudia tanto los componentes fotónicos como los escotónicos del electroretinograma, pudiendo adaptarse a distintas especies animales, salvando así las diferencias anatómicas.

El diseño experimental de nuestro trabajo estuvo encaminado a detectar variaciones, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, sobre los componentes del electroretinograma del perro en función de dos factores, la capnia y el tipo de anestésico. Por lo tanto, con el presente trabajo, pretendemos obtener información acerca de cómo el empleo de isoflurano o de sevoflurano en dos situaciones anestésicas diferentes (normocapnia e hipercapnia), afecta a los distintos componentes del ERG del perro, utilizando un protocolo estandarizado. Por otra parte, esperamos poder aportar información a nivel clínico y a nivel toxicológico acerca de cómo la hipercapnia afecta al ERG, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Determinar los efectos de la hipercapnia sobre los componentes fotónicos y escotónicos del ERG del perro.
- Estudiar los efectos del isoflurano y del sevoflurano sobre los componentes fotónicos y escotónicos del ERG del perro, y determinar si estos anestésicos son aptos para la realización de este tipo de examen.
- Esclarecer el origen de algunos de los componentes del electroretinograma del perro.

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTORRETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.-

1- LA RETINA:

1.1.- DESARROLLO EMBRIOLÓGICO:

Al cerrarse el tubo neural, se divide en 3 partes: proencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, que en una segunda diferenciación darán las 5 partes del encéfalo (mielencéfalo, metencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo y telencéfalo) y casi inmediatamente aparecen unos abultamientos laterales del diencéfalo formando las vesículas ópticas, por ello se dice que la retina proviene directamente del tubo neural que se proyecta hacia las estructuras superficiales del organismo, y es por lo tanto parte del sistema nervioso central. Se forma la cúpula óptica por cuyo interior transcurre el ventrículo óptico, una extensión del tercer ventrículo del diencéfalo, que se va progresivamente cerrando hasta convertirse en la capa que rodea al tejido nervioso formando más tarde el epitelio pigmentario (EPR) de la retina que arropa externamente los fotorreceptores (FR). Según va madurando la cúpula óptica se van aproximando más sus dos capas: la interna o nerviosa y la externa o pigmentaria, que se va haciendo más fina y aparecen los primeros gránulos de pigmento (Aguirre *et al.*, 1972; Hoar, 1982).

Gran parte de este desarrollo ocurre en el útero materno, y el nivel de madurez de la función visual depende de la especie animal. Así por ejemplo, en el conejillo de indias (*Carvia Porcellus*), que nace con los ojos abiertos el desarrollo es similar al del hombre en base a que las respuestas electroretinográficas en las primeras etapas de vida son muy parecidas (Armitage *et al.*, 2001). Según Breton *et al.*, en el humano al nacimiento la funcionalidad de los FR no es completa debido a la poca concentración de algunos sustratos de la fototransducción del neonato y a una escasa longitud de los segmentos externos de los FR. Los FR tendrían un desarrollo más tardío que otras células más internas de la retina, en base a estudios electroretinográficos realizados en el hombre (Breton *et al.*, 1995). En el caso del perro y del gato que nacen con los ojos cerrados el desarrollo es más tardío y continúa en parte en la vida postnatal. Así la retina alcanza su madurez morfológica a las 6-7 semanas de vida en el perro (Gum *et al.*, 1984), y a los 5 meses en el gato (Vogel, 1978).

1.2.- ESTRUCTURA GENERAL:

La retina es como un tapiz que recubre el fondo del ojo cuyo espesor en el perro es de 200 a 240 μm en la zona central y de 100 a 190 μm en la zona periférica (Buttery *et al.*, 1991). En los vertebrados está invertida con respecto a la dirección de los rayos luminosos. En efecto, la luz después de atravesar la óptica ocular, debe traspasar todo el espesor de la retina antes de alcanzar

los segmentos externos de los FR (conos y bastones) que contienen el pigmento fotosensible (Samuelson, 1999). Esto es porque las membranas de los FR que contienen los fotopigmentos han de estar en contacto con la capa de EPR que le suministra la molécula visual por excelencia, el retinol o vitamina A, que permanece unida a una proteína (opsina), donde un pequeño cambio en su conformación en respuesta a un fotón, desencadenará todo el proceso de la fototransducción (Kolb, 2003).

Los estudios de Ramón y Cajal, utilizando el método de tinción de Golgi, sentaron las bases neuroanatómicas del sistema nervioso en general, y del sistema visual en particular describiendo los principales tipos celulares a nivel de la retina: FR, células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células ganglionares (**figura 1**) (Cajal, 1892, traducido por Thorpe y Glickstern, 1972).

Desde un punto de vista anatómico la retina está formada por la neuroretina y el EPR. Este último en algunas especies animales no está totalmente pigmentado (Tso y Friedman, 1967). La neuroretina en todos los vertebrados está compuesta por tres capas que contienen cuerpos celulares y dos capas de interacciones sinápticas (denominadas plexiformes). La capa nuclear externa (CNE) contiene los cuerpos celulares de los conos y bastones. La capa nuclear interna (CNI) contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares y amacrinas y la capa de células ganglionares (CCG) contiene los cuerpos celulares de estas células ganglionares además de los de algunas células amacrinas desplazadas (Wässle y Boycott, 1991). Entre estas 3 capas se localizan las capas plexiformes donde se realizan la mayor parte de contactos sinápticos de la retina (Kolb, 2003).

La plexiforme externa (CPE) es en donde contactan los conos y bastones con las dendritas de las células bipolares y con las células horizontales (Kolb, 1970). En la plexiforme interna (CPI) se produce la segunda sinapsis de la vía vertical de la retina. Aquí contactan los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares. Además, a este nivel terminan gran cantidad de prolongaciones de las células amacrinas, que influyen y modulan la información que es transferida a las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico (NO) por donde sale la información ya codificada hacia la corteza visual (**figura 1**) (Wässle y Boycott, 1991; Kolb, 2003).

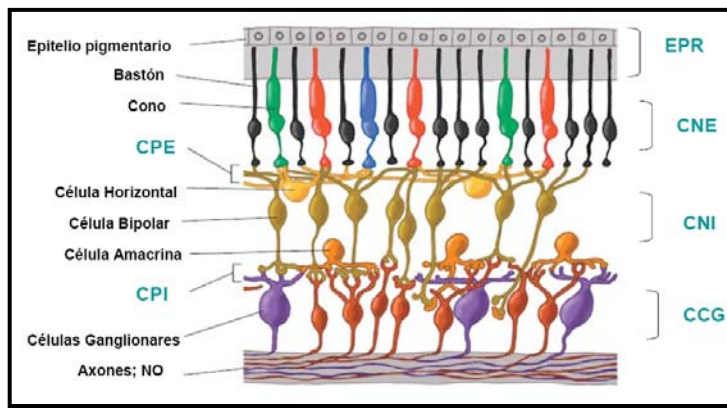


Figura 1: Esquema de las diferentes capas de la retina y de las células que la componen (adaptado de: Kolb, 2003).

1.3.- DIVISIÓN FUNCIONAL:

Dividiendo la retina desde un punto de vista funcional, se pueden distinguir cuatro capas o zonas (Lazard *et al.*, 2000):

- Capa pre-receptora
- Capa receptora
- Capa post-receptora
- Capa de conducción

1.3.1.- CAPA PRE-RECEPTORA:

1.3.1.1.- EPITELIO PIGMENTARIO (EPR):

El EPR separa la neurorretina de la coroides y por debajo del mismo nos encontramos con el espacio subretiniano. Está formado por una sola capa de células unidas entre sí por uniones intercelulares muy complejas. Su parte basal reposa sobre la membrana de Bruch y su parte apical posee numerosas expansiones citoplasmáticas. Las más largas y estrechas de esas expansiones se hunden entre los segmentos externos de los FR en una sustancia (matriz) formada por mucopolisacáridos y carbohidratos, mientras que las expansiones más cortas y anchas forman vainas alrededor de la parte apical de los FR. Este encaje entre los FR y dichas vainas crea una superficie de contacto muy importante entre las dos capas celulares, favoreciendo los intercambios en el interior del espacio subretiniano, limitado proximalmente por las expansiones de las células de Müller (Tso y Friedman 1967; Samuelson, 1999).

Las funciones del EPR son muy importantes y muy variadas. Por un lado, constituyen una trampa de fotones, ya que en las zonas pigmentadas (variables según la especie), la presencia de

melanosomas cercanos a la parte apical, hace que el EPR se comporte como una pantalla opaca absorbiendo los fotones que atravesaron la neuroretina sin estimular los FR (Kommonen *et al.*, 1991). Por otro lado, tienen un papel importante en la constitución de la barrera hemato-retiniana, similar al de las células gliales que protegen las células nerviosas del encéfalo (Steinberg, 1985). Dentro de sus importantes funciones metabólicas destacan:

- Stock y liberación de vitamina A, a través de su membrana apical a lo largo del metabolismo y la regeneración de los pigmentos visuales, cuyo déficit produce ceguera nocturna además de enlentecimiento en la producción de nuevos segmentos externos en los FR (Crouch *et al.*, 1996; Herrón *et al.*, 1974).
- Fagocitosis regular de una pequeña porción de la membrana de los artículos externos de los FR que se renuevan periódicamente con un ritmo circadiano. El fagosoma resultante se transporta desde la zona apical a la zona basal del EPR en donde se fusiona con un lisosoma para su degradación; los catabolitos resultantes se transfieren a la circulación coroidea (Ishikawa y Yamada, 1970; Young, 1971).
- Aporte nutritivo a los FR para formar sus nuevas membranas (Young, 1971).

El EPR es el responsable de la existencia de un potencial córneo-retiniano. En efecto, cuando se coloca *in vivo* un electrodo a uno y otro lado del EPR se registra un potencial trans-epitelial de unos 6 mV independiente del nivel luminoso; el llamado potencial de reposo. Esto permite asimilar la retina a un dipolo eléctrico. Así, el campo eléctrico generado por este dipolo se manifiesta fuera del EPR; las cargas negativas y positivas se propagan por los distintos medios del ojo cuya resistencia es baja. La electropositividad es recogida a nivel de la córnea y la electronegatividad en región escleral y periocular (Arden *et al.*, 1962; Kommonen *et al.*, 1991; Marmor, 1991).

Trabajos sobre retinas bovinas han permitido identificar canales iónicos específicos y co-transportadores a nivel de la membrana apical y a nivel de la membrana basal asociados a sistemas de transmisión intracelulares (mediante mensajeros). Las conductancias de estos diferentes canales iónicos se regulan en función de la composición del medio que los rodea (Edelman y Miller, 1990; Joseph y Miller, 1991).

La membrana apical de la célula epitelial posee un canal específico para el transporte de los iones de K^+ controlado en parte por el transporte activo mediante una bomba de Na^+/K^+ . Esta membrana tiene asimismo la posibilidad de integrar a partir del medio subretiniano una combinación de iones de $Na^+-K^+-Cl^-$ por un lado y $Na^+-HCO_3^-$ por el otro, por la acción de un co-transportador asegurando su paso a través de la membrana y permitiendo así la regulación del pH celular.

La membrana basal es permeable a los iones de K^+ y de Cl^- por medio de dos canales distintos. El transporte de otros iones como el Na^+ y el bicarbonato (HCO_3^-) se efectúa indirectamente con la

ayuda de co-transportadores. Estos fenómenos de transportes iónicos juegan un papel fundamental contribuyendo a mantener el volumen de la célula, su hidratación, el pH y el potencial transmembrana (**figura 2**) (Joseph y Miller, 1991). Este último es muy sensible a las variaciones de concentración iónica en particular la de K^+ (Oakley, 1977). La reabsorción de agua a partir del espacio subretiniano es esencial para la cohesión entre el EPR y la capa de los FR. En efecto, las células del EPR se comportan como los astrocitos del sistema nervioso central y de la retina; regulan la cantidad de K^+ y de neurotransmisores en el espacio subretiniano así como la cantidad de agua (Schnitzer, 1988).

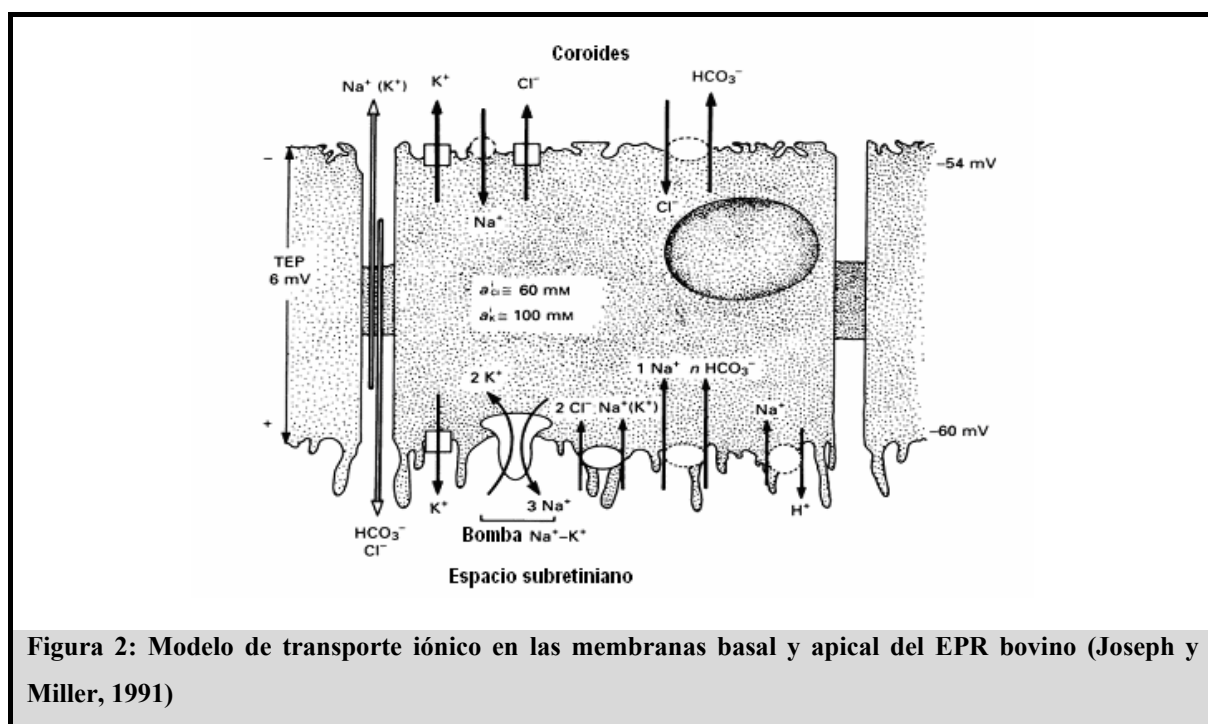


Figura 2: Modelo de transporte iónico en las membranas basal y apical del EPR bovino (Joseph y Miller, 1991)

1.3.1.2.- TAPETUM LUCIDUM (TL):

En los ojos de los mamíferos se encuentran diferencias anatómicas, según el nivel de adaptación a la luz, en la organización de la retina, el sistema óptico, el tamaño del ojo y la presencia de estructuras especializadas como es el *tapetum lucidum* (TL). El TL influye en la sensibilidad a la luz, ya que ofrece una segunda oportunidad de estimular los FR en niveles bajos de iluminación, al reflejar la luz que llega a la retina (Ollivier *et al.*, 2004).

En el perro tiene forma triangular, de bordes redondeados con la base orientada horizontalmente excluyendo el disco óptico, y el ápex hacia arriba. Cubre un área que ronda el 30% del fundus superior (**figura 3**) (Lesiuk y Braekevelt, 1983). El hombre así como varias especies animales (monos, cerdos) no poseen TL (Ollivier *et al.*, 2004).

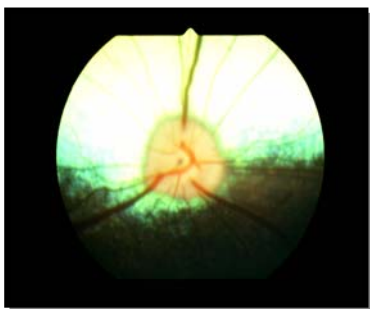


Figura 3: Fondo de ojo del perro, en el que se aprecia el TL (zona brillante superior).

1.3.2.- CAPA RECEPTORA:

Esta capa se corresponde con la neurorretina y en concreto con la zona más externa de la misma; la CNE, en donde se encuentran los cuerpos celulares de los FR, conos y bastones (Wässle y Boycott, 1991).

1.3.2.1.- ESTRUCTURA:

Se trate de un cono o de un bastón, todos los FR están constituidos por un segmento externo y otro interno unidos por un cilio conector. Los conos presentan una estructura cónica, con sus núcleos alineados en una sola capa justo por debajo de la membrana limitante externa. Sus segmentos internos y externos se proyectan dentro del espacio subretinal hacia el EPR (Samuelson, 1999). Su tiempo de respuesta es muy corto y proporcional a la cantidad de energía recibida. Son los responsables de la visión coloreada en ambiente fotópico (Baylor, 1987).

Los bastones poseen una morfología alargada con sus segmentos internos y externos relleno del espacio entre los conos y los procesos de las células del EPR. Los cuerpos celulares de los bastones constituyen el resto de la CNE, donde se sitúan formando varias capas (Samuelson, 1999). Son sensibles a bajas frecuencias espaciales y temporales y a las cortas longitudes de onda. Solo tienen un tipo de pigmento; la rodopsina, no participan en la apreciación de los colores. Funcionalmente los conos se diferencian de los bastones por su sensibilidad lumínica. Mientras que los bastones son capaces de detectar un fotón de luz o mínima cantidad de energía lumínica conocida (Taylor *et al.*, 2004), los conos precisan intensidades mil veces superiores para producir una variación de potencial en su membrana (Baylor, 1987).

Los segmentos internos de los bastones son más delgados que los de los conos y ambos están repletos de largas mitocondrias (Miller *et al.*, 1989). A partir de los cilios que unen el segmento externo al interno se producen una serie de evaginaciones e invaginaciones de la membrana

plasmática de los FR, que dan lugar a los segmentos externos (Young, 1971). Esta es la porción de los FR donde se encuentran los pigmentos visuales. A nivel de los bastones, los segmentos externos están constituidos por discos membranosos aislados de la membrana plasmática donde se encuentran inmersos los pigmentos sensibles a las radiaciones luminosas. Por contra en los conos no existen discos membranosos aislados sino múltiples repliegues de la membrana plasmática (**figura 4**) (Steinberg *et al.*, 1980).

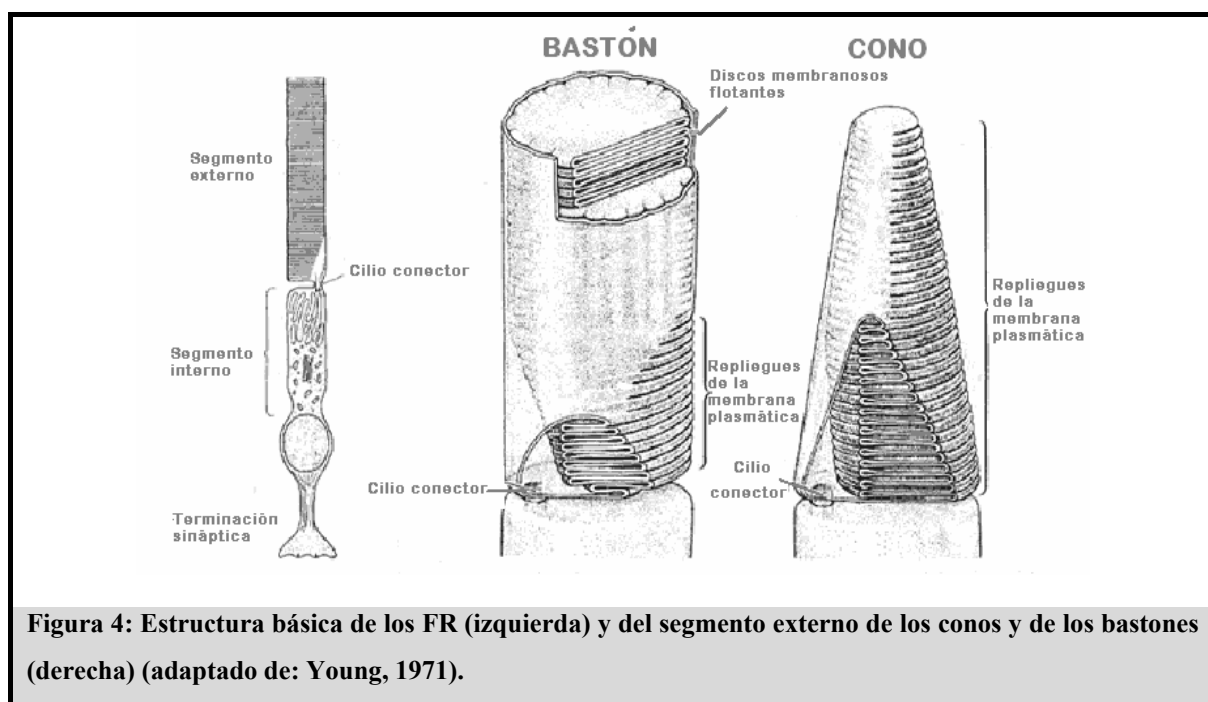


Figura 4: Estructura básica de los FR (izquierda) y del segmento externo de los conos y de los bastones (derecha) (adaptado de: Young, 1971).

A diferencia de los bastones, que forman un sólo tipo morfológico y funcional, en el hombre existen tres tipos de pigmentos para conos (yodopsinas) que dan lugar a tres tipos de conos: unos que presentan una sensibilidad máxima para las longitudes onda más largas (L), otros con mayor sensibilidad a las longitudes de onda medias (M) y otros con mayor sensibilidad a las longitudes de onda más cortas (S). Estos tres tipos de conos no son numéricamente iguales y dan lugar a la visión tricromática que poseen los humanos (Gouras, 1984).

Algunas especies de mamíferos poseen una visión dicromática debido a la presencia de sólo dos tipos de conos: los sensibles a las longitudes de onda medias y cortas. Es el caso del perro, que solo tiene dos tipos de pigmentos uno con un pico de absorción espectral de 429 nm (conos S) y otro de 555 nm (conos M) (Neitz *et al.*, 1989) así como del zorro que también es dicromático (**figura 5**) (Jacobs *et al.*, 1993).

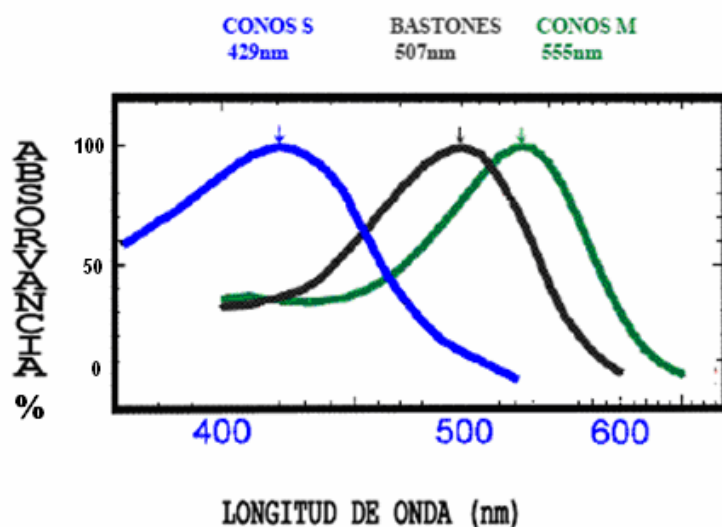


Figura 5: Curvas de probabilidad de absorción espectral de los bastones y de los diferentes tipos de conos del perro según Neitz *et al.*

El pigmento visual de los bastones que se encuentra en sus segmentos externos es la rodopsina (**figura 6**) (Kolb, 2003). Esta formada por una molécula proteica, la opsina, que se fabrica en el aparato de Golgi (situado en los segmentos internos), y el retinal (Papermaster *et al.*, 1985). La opsina se dirige hacia la zona del cilio de unión gracias a la acción de proteínas G y desde aquí pasa ya hacia el segmento externo (Derecic y Papermaster, 1995).

La otra parte del pigmento visual, el retinal (derivado de la vitamina A) es proporcionado a los discos desde el EPR a través de proteínas transportadoras que se encuentran a nivel de la matriz que existe entre los distintos FR (Steinberg, 1985).

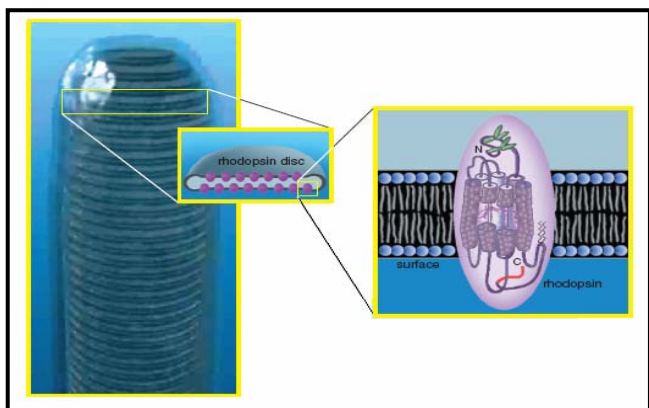


Figura 6: Segmento externo de un bastón y de las moléculas de rodopsina incluidas en la membrana plasmática de sus discos (Kolb, 2003).

1.3.2.2.- DISTRIBUCIÓN:

En el centro de la retina se encuentra una estructura redondeada de tamaño y forma diferente según las especies. Esta zona se denomina papila y corresponde al nacimiento del NO, está desprovista de FR y se conoce como punto ciego (Brooks *et al.*, 1999). En la zona dorso-lateral de la papila se encuentra una zona estrecha y horizontal, con gran presencia de FR y células ganglionares; el *área centralis*, presente en la mayoría de los mamíferos. Es a este nivel donde se enfocan los rayos luminosos y se produce la máxima agudeza visual debido a la gran concentración de conos (Rapaport y Stone, 1984).

Generalmente en los mamíferos hay más cantidad de bastones que de conos. La especie felina tiene una densidad media de bastones de $250000/\text{mm}^2$ y están repartidos de manera más o menos homogénea por toda la retina. En esta especie la densidad de conos en el *área centralis* ronda los $26000/\text{mm}^2$, siendo en la periferia sustancialmente menor (unos 4000 conos/ mm^2) (Steinberg *et al.*, 1973). El perro posee solamente un 3% de conos y su proporción con respecto a los bastones es mayor en el *área centralis* (20%), disminuyendo en la retina periférica (Koch y Rubin, 1972).

El hombre tiene un 5% de conos y sus bastones se encuentran repartidos por toda la retina siendo menos numerosos en la retina central y ausentes en la fovea (zona de máxima agudeza visual del hombre; solo contiene conos) (Jonas *et al.*, 1992).

En base a la proporción de conos y de bastones, los vertebrados desde el punto de vista de la percepción de la luz pueden ser divididos en tres clases principales: animales diurnos (adaptados a la luz brillante; algunos tipos de serpientes), animales nocturnos (adaptados a la oscuridad; ratas), y animales arrítmicos (adaptados a cualquier tipo de iluminación; gato, perro, mono, humano...) (Samuelson, 1999).

1.3.2.3.- TERMINACIONES SINÁPTICAS:

La información que codifican los FR, respecto al número de cuantos de luz y su sensibilidad respecto a las distintas longitudes de onda es transmitida a través de sus terminaciones sinápticas. Estas terminaciones son de forma triangular y se denominan pedículos en el caso de los conos, mientras que su morfología es redondeada, denominándose esférulas en el caso de los bastones. Ambos tipos de terminaciones están rellenas de vesículas sinápticas. Además, a nivel de las sinapsis con los siguientes tipos celulares (células horizontales y bipolares) contienen unas estructuras densas que se conocen como sinapsis en cintilla. Cada pedículo presenta aproximadamente unas 30 de estas sinapsis en cintilla mientras que las esférulas de los bastones contienen solo unas 2 de estas sinapsis en cintilla (Kolb, 1970).

A nivel de los pedículos las sinapsis en cintilla forman unas estructuras que se conocen como triadas en las que encontramos 3 procesos: 2 procesos laterales que corresponden a células horizontales y un proceso central, alineado con la sinapsis en cintilla, que corresponde a una célula bipolar invaginante. Además, existen otros tipos de células bipolares que también contactan con el pedículo mediante contactos superficiales; son las células bipolares superficiales (Kolb *et al.*, 1981; Wässle y Boycott, 1991).

Las esférulas de los bastones presentan sólo 2 sinapsis en cintilla, que dan lugar a unas estructuras conocidas como diadas en las que existen un elemento lateral y un elemento central. Los elementos laterales son terminaciones axónicas de las células horizontales mientras que los elementos centrales corresponden a dendritas invaginantes de las células bipolares para bastones. No existen habitualmente contactos superficiales a nivel de las esférulas de los bastones (Sharpe y Stockman, 1999). Aunque se trate de sinapsis en cintilla (conos y bastones) o superficiales (solo conos) el neurotransmisor es el mismo: el glutamato (Massey, 1990). Además de estos tipos de contactos sinápticos también existen sinapsis de tipo eléctrico (uniones “gap”) entre conos y conos y entre conos y bastones a nivel de la retina de los mamíferos. Así, los pedículos de los conos presentan unas pequeñas proyecciones laterales que se denominan telodendritas y que forman pequeñas sinapsis eléctricas (Kolb, 2003).

1.3.2.4- FOTOTRANSDUCCIÓN:

La fototransducción consiste en la conversión de energía lumínica (fotón) en señales electroquímicas (Baylor, 1987; Stryer, 1991; Yau, 1994).

Las células fotorreceptoras de la retina, conos y bastones, son capaces de sintetizar moléculas sensibles a la energía luminosa (Papermaster *et al.*, 1985). Dichas moléculas, conocidas tradicionalmente como fopigmentos, son proteínas de membrana capaces de unir un derivado de la vitamina A, el retinal, en su configuración 11-cis. Cuando la energía luminosa incide sobre el fopigmento, produce la conversión del 11-cis-retinal en todo-trans-retinal, desencadenando una cascada de reacciones enzimáticas que acaban generando un cambio en la conductancia iónica de la membrana provocando variaciones de potenciales locales y la hiperpolarización de la membrana de los FR (Yau, 1994). En efecto, en oscuridad a nivel del segmento externo de los FR existe lo que se conoce como **corriente oscura** debido a un flujo entrante de iones compuesto por Na^+ (80%) y Ca^{2+} (20%) gracias a canales $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mantenidos abiertos bajo la influencia de una gran concentración de GMPc (Yau y Nakatani, 1984; Yau y Baylor, 1989). Este potencial está asegurado además por un flujo de iones que entran y salen: entran 4 Na^+ y salen un Ca^{2+} y un K^+ gracias a un transportador (**figura 7**) y a nivel del segmento interno una bomba de Na^+/K^+ intercambia 3 Na^+ entrantes contra 2 K^+ salientes. Estos fenómenos aseguran un equilibrio iónico

que mantiene el FR despolarizado en oscuridad (Yau, 1994). Dicho equilibrio se rompe con la exposición a la luz cerrándose los canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependientes de GMPc provocando la hiperpolarización del FR (**figura 7**) (Yau y Baylor, 1989).

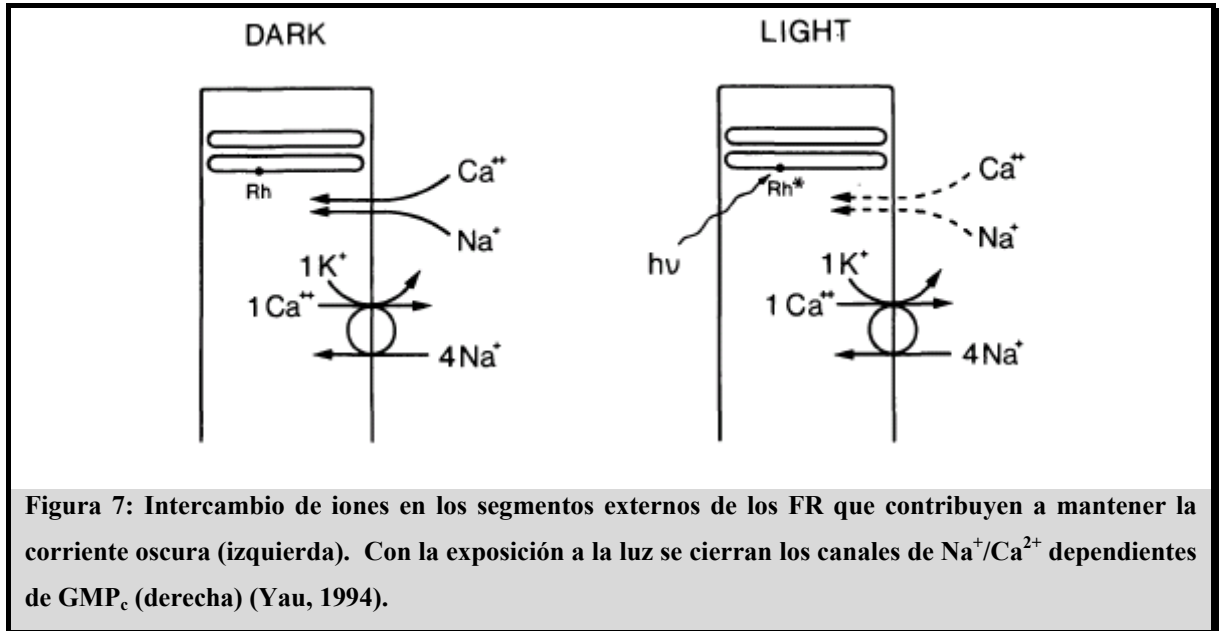


Figura 7: Intercambio de iones en los segmentos externos de los FR que contribuyen a mantener la corriente oscura (izquierda). Con la exposición a la luz se cierran los canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependientes de GMPc (derecha) (Yau, 1994).

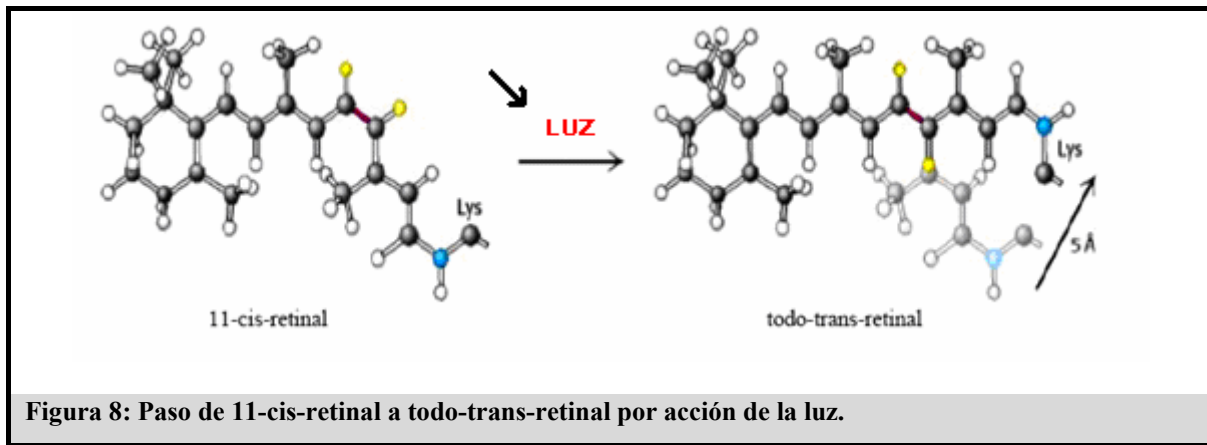
1.3.2.4.1.- FASE DE EXCITACIÓN:

En la fase de excitación de la fototransducción existen tres ciclos fundamentales (Stryer, 1991):

1. Ciclo de activación de la rodopsina.
2. Ciclo de activación e inactivación de la fosfodiesterasa (FDE).
3. Ciclo de hidrólisis de la síntesis de GMPc .

El potencial del FR consiste pues en una señal hiperpolarizante que será conducida a lo largo de la membrana del fotorreceptor hasta su terminal axónica, donde conos y bastones establecen conexiones sinápticas con las células horizontales y bipolares (Kolb, 2003).

Cuando la rodopsina absorbe la energía lumínica, el pigmento se descompone en billonésimas de segundo, la causa es la fotoactivación de los electrones de la fracción retinal de la rodopsina, que determina un cambio instantáneo de la forma 11-cis-retinal a la forma todo-trans-retinal que conserva la misma estructura química que la forma cis, pero con una estructura física distinta convirtiéndose en una molécula recta; este proceso se llama fotoisomerización (**figura 8**) (Farahbakhsh *et al.*, 1993).



Esta fotoisomerización del retinal es el acontecimiento inicial de la excitación visual que llevará a la formación de una serie de intermediarios transitorios con propiedades espectroscópicas características. Entre estos metabolitos destaca la metarrodopsina II (rodopsina activada). Por último, y de forma ya mucho más lenta, del orden de segundos, la rodopsina se descompone en productos completamente disociados: opsina y todo-trans-retinal (Yau, 1994).

La metarrodopsina II (con todo-trans retinal), desencadena una cascada enzimática a través de la transducina (proteína G) y FDE activada cuyo efecto es la hidrólisis del GMPc, con la consiguiente caída del GMPc inducida por la luz (Gudermann *et al.*, 1997). Ante el descenso de GMPc, se produce el cambio conformacional de la proteína del canal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que determina el cierre del mismo, con la disminución del flujo de iones de Na^+ hacia el interior celular se produce un gradiente eléctrico que excita al bastón, hiperpolarizándolo (**figura 10**) (Yau y Baylor, 1989).

Así se produce la primera fase de amplificación nerviosa, ya que una sola molécula de rodopsina activada cataliza la activación de 100 moléculas de transducina, que a su vez activan a 100 moléculas de FDE. Estas últimas presentan un gran poder catalítico, ya que pueden hidrolizar 10000 moléculas de GMPc que a su vez cierran 1000 canales de Na^+ (Stryer, 1991).

El fenómeno de la transducción con la consiguiente hiperpolarización de la membrana del FR tiene consecuencias sobre la liberación del neurotransmisor de los FR (glutamato) en las sinapsis. En términos neurofisiológicos una despolarización se corresponde con una excitación y una hiperpolarización con una inhibición. Para que el glutamato sea liberado por el FR necesita tener cierto grado de **despolarización**. La cantidad liberada aumenta en función del nivel de despolarización. Por lo tanto en oscuridad el FR que se encuentra desopolarizado (corriente oscura) está liberando glutamato de manera continua. Cuando la luz estimula a los FR y se hiperpolarizan se reduce dicha liberación. Resumiendo, paradójicamente, todo ocurre como si el FR estuviera excitado en oscuridad e inhibido con la luz (Yau, 1994).

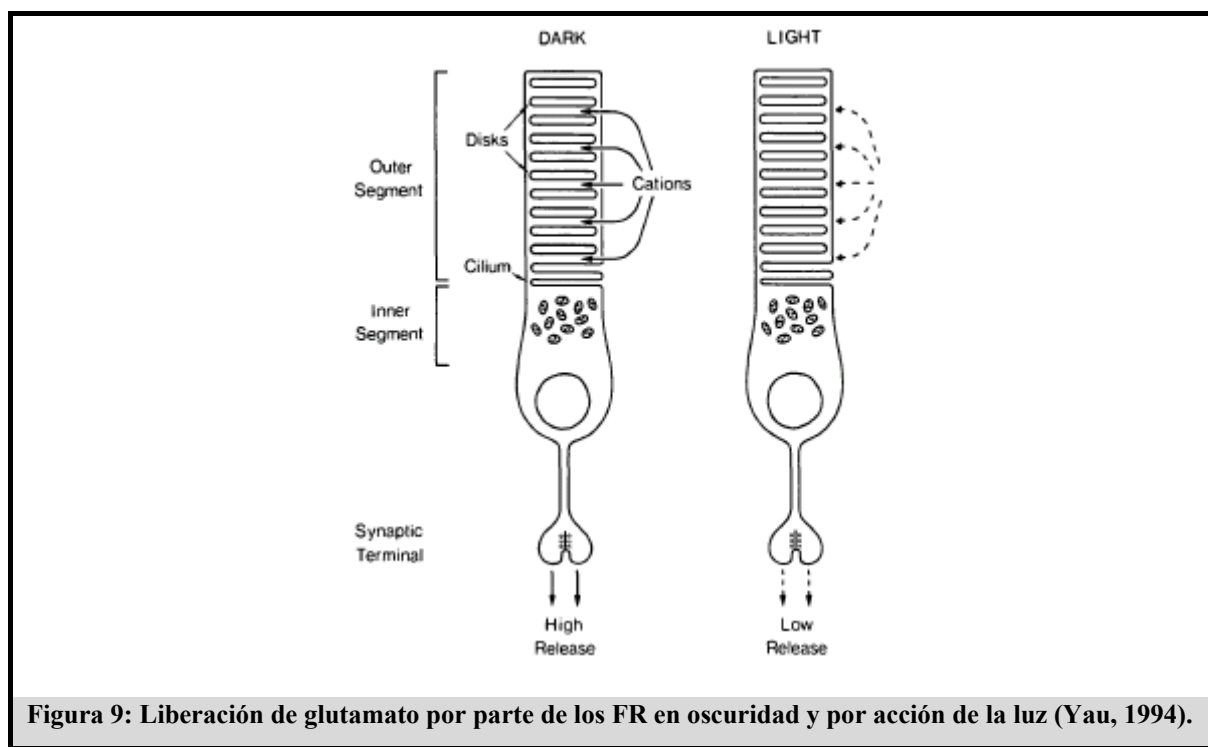


Figura 9: Liberación de glutamato por parte de los FR en oscuridad y por acción de la luz (Yau, 1994).

Desde un punto de vista electrofisiológico, tras la activación luminosa el fotorreceptor pasa de su estado de despolarización ($-40 \mu\text{V}$) a un estado de hiperpolarización (hasta $80 \mu\text{V}$). La amplitud de esta hiperpolarización depende de la cantidad de energía luminosa que estimula al fotorreceptor, dentro de su rango de absorción (Fain *et al.*, 2001).

1.3.2.4.2.- FASE DE RECUPERACIÓN:

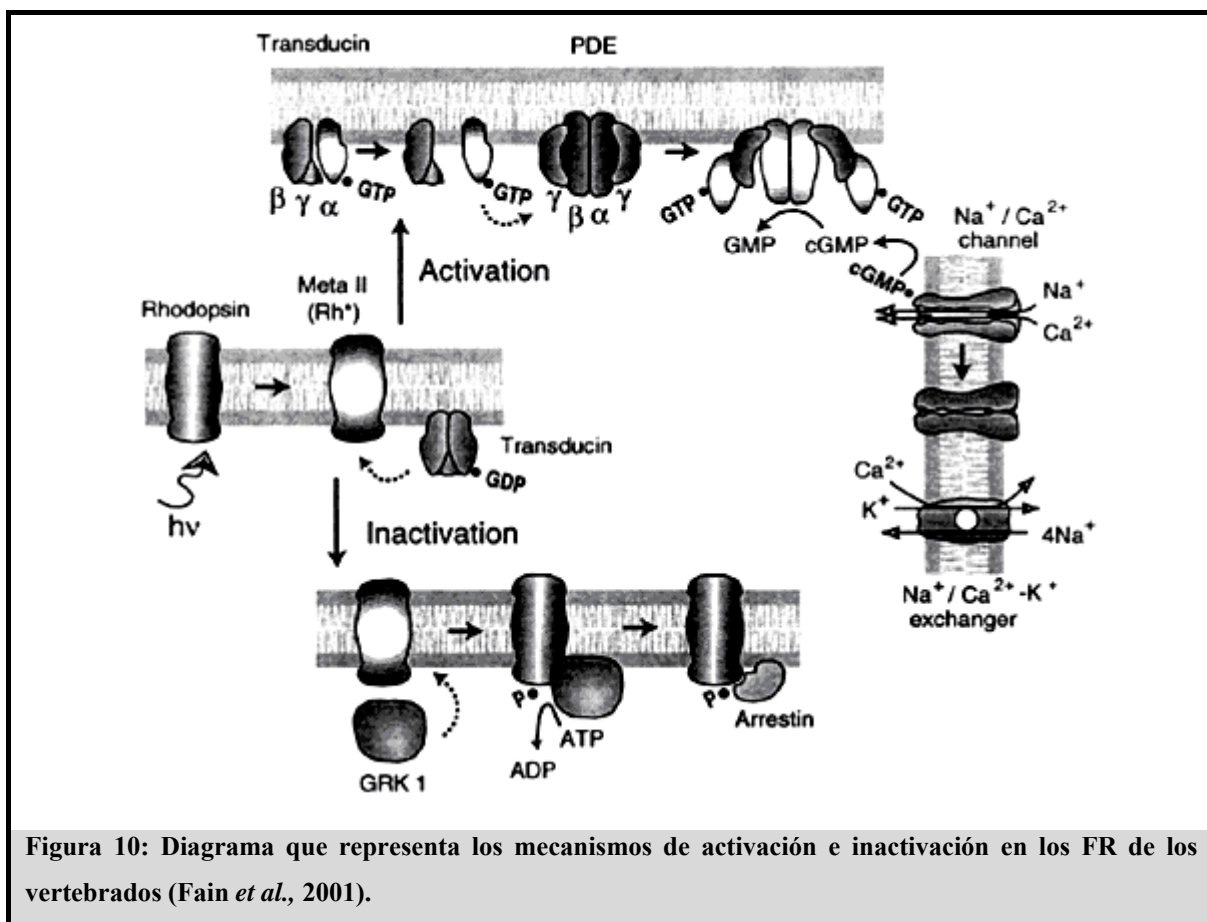
La desactivación de la rodopsina fotoexcitada (metadoropsina II) se realiza en dos pasos; primero por fosforilación mediante la rodopsina quinasa para que a continuación, la enzima arrestina se combine con la metadoropsina activada; estos dos procesos detienen la cascada de la transducción (Bownds *et al.*, 1972). La transducina, como todas las proteínas G tiene la propiedad de autoinactivarse y de recuperar su conformación inicial compuesta por tres subunidades (Gudermann *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 2003). El cierre de los canales de membrana ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) conlleva al aumento de Ca^{2+} intracitoplasmático, dicho aumento va a activar una ciclase que vuelve a formar GMPc a partir de GTP y de una enzima llamada recoverina. Al volver a aumentar la concentración de GMPc se vuelven a abrir los canales $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ GMPc-dependientes posibilitando así el recommienzo del ciclo (**figura 10**) (Yau y Nakatani, 1984; Yau y Baylor, 1989).

Existe pues una regulación permanente de los niveles de GMPc permitiendo continuar en el tiempo la absorción de fotones. El papel del calcio es muy importante permitiendo a los bastones adaptarse a la luz por modulación del cierre y apertura de los canales (Yau, 1994; Fain *et al.*, 2001).

El ciclo se cierra con la isomerización del todo-trans a 11-cis-retinal en condiciones de oscuridad, esta reconversión requiere de energía metabólica y está catalizada por la enzima retinal isomerasa, una vez formado el 11-cis retinal se recombina automáticamente con la opsina para volver a formar rodopsina; dicha unión se realiza mediante la formación de un enlace no covalente seguido por la formación de uno covalente (Kefalov *et al.*, 2001). La rodopsina así formada permanece estable hasta que la absorción de energía lumínica vuelve a desencadenar su descomposición (Crouch *et al.*, 1996).

Existe una segunda vía química para esta regeneración que consiste en la conversión por reducción del todo-trans retinal primero en todo-trans retinol que es una forma de la vitamina A, este a su vez se transforma en 11-cis retinol, y por último en 11-cis retinal que se unirá a la opsina (Chen *et al.*, 2005).

La vitamina A está presente en el citoplasma de los conos así como en el EPR de la retina, por lo tanto siempre se encuentra disponible para formar nuevo retinal cuando se necesita, y cuando la cantidad de retinal es excesiva en la retina el sobrante se convierte de nuevo en vitamina A, disminuyendo la cantidad de fotopigmento en la retina (Crouch *et al.*, 1996). Esta interconversión entre retinal y vitamina A contribuye a la adaptación a largo plazo de la retina a diferentes intensidades de luz (Fain *et al.*, 2001).



1.3.2.5.- ADAPTACIÓN A DISTINTOS NIVELES LUMINOSOS:

En oscuridad la rodopsina mantiene su forma *cis*, pero cuando se absorbe un fotón de luz se transforma rápidamente en *todo-trans*, esto cambia su forma y por lo tanto la forma de la proteína (opsina) también, este proceso se conoce con el nombre de blanqueamiento (Yau, 1994). La acción inversa, el paso de *todo-trans-retinal* a *11-cis-retinal*, requiere una reacción enzimática y es mucho más lenta. La molécula de *todo-trans retinal*, a través de enzimas y transportadores, es llevada al EPR donde es transformada nuevamente en *11-cis retinal* y devuelta al bastón con mediación de proteínas G, siendo un proceso que lleva varios minutos (Deretic y Papermaster, 1995). En el caso de los conos la regeneración de sus pigmentos es hasta 20 veces más rápida (Mata *et al.*, 2000).

En cuanto a los conos, existe un fenómeno de adaptación a distintos ambientes luminosos. Así cuando se pasa de un ambiente oscuro a uno iluminado, si se realizan ERGs se aprecia que las amplitudes van aumentando durante los primeros minutos, esto se conoce como efecto de adaptación a la luz. Algunos autores creen que se trata de cambios en el potencial de reposo (Biersdorf y Armington, 1960) y otros que se trata de re-despolarizaciones que tienen lugar en los conos (Gouras y Mackai, 1989). Según Benoit y Lachapelle este efecto está mediado no por uno, sino por dos mecanismos o rutas retinianas distintas, todavía desconocidas (Benoit y Lachapelle, 1995).

Los conos recuperan su corriente circulante muchísimo más rápido que los bastones. Mientras a los bastones les cuesta recuperar su corriente circulante unos 15- 20 minutos tras estar expuestos a un ambiente luminoso que blanquea gran parte de sus pigmentos, a los conos les basta con unos segundos. En efecto, estudios electrorretinográficos tras exposición de la retina a ambientes luminosos intensos que causan el blanqueamiento de gran parte de los pigmentos de los conos, demostraron que con estímulos intensos la recuperación del ERG es rapidísima para los conos. Esto se podría deber a que son capaces de aprovechar fotoproductos del proceso de blanqueamiento para mantener su corriente circulante. Sin embargo, con flashes débiles el tiempo de recuperación es más largo, correspondiendo con el tiempo de regeneración de los fotopigmentos de los conos. Indicando además que la sensibilidad de los conos a flashes débiles depende de la cantidad de fotopigmentos (Paupoo *et al.*, 2000).

Estas diferencias fisiológicas entre los conos y los bastones se deben en parte a que el *11-cis retinal* en su unión covalente inicial con la opsina provoca la desactivación de la cascada de fototransducción en el caso de los conos, mientras que en los bastones provoca una activación

transitoria de la misma enlenteciendo el proceso de adaptación a la oscuridad (Kefalov *et al.*, 2001).

1.3.3.- CAPA POST-RECEPTORA:

En esta capa se encuentran las células bipolares además de células de asociación (amacrinas, horizontales e interplexiformes) y de sostén (células de Müller) (Wässle y Boycott, 1991).

1.3.3.1.- CÉLULAS BIPOLARES:

Las células bipolares conectan con las terminaciones sinápticas de los FR y transmiten las señales hacia las células ganglionares. Representan el segundo peldaño de la vía vertical de la retina (FR-bipolares-ganglionares) y el neurotransmisor que utilizan es el mismo que el que usan los FR y también la mayoría de las células ganglionares; el glutamato (Kolb, 2003).

1.3.3.1.1.- TIPOS:

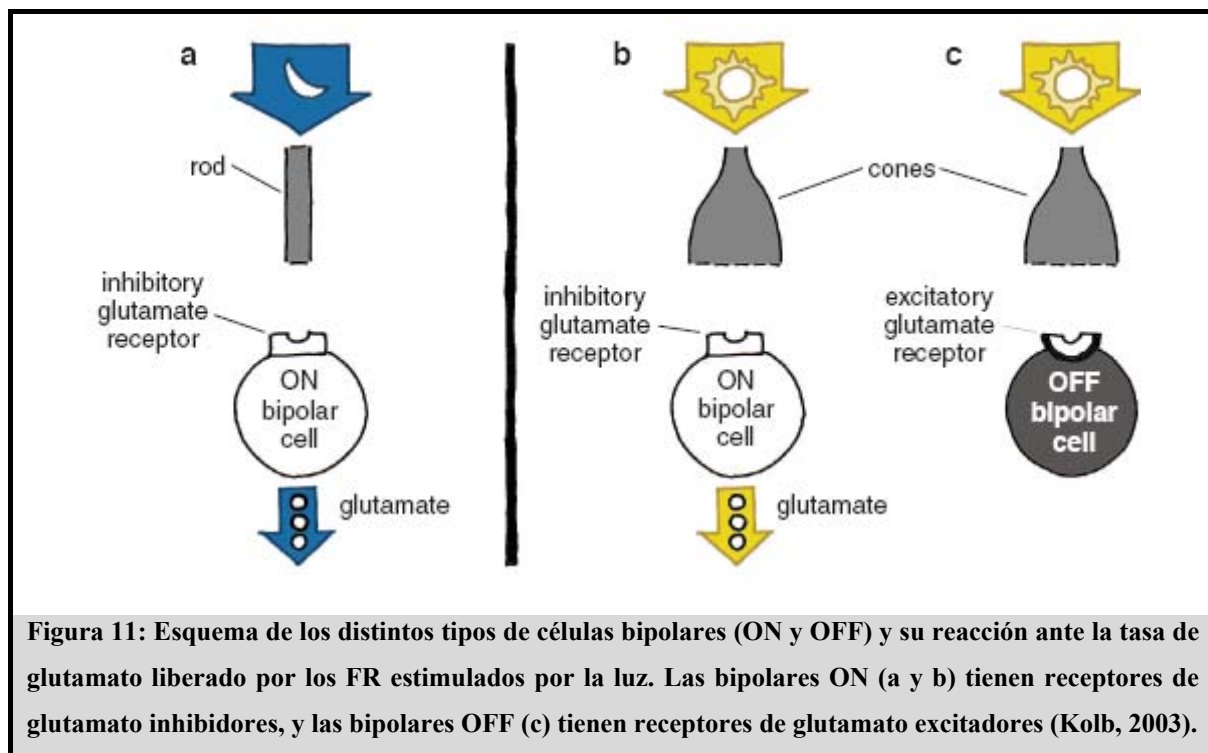
El número de tipos de células bipolares es variable en función de la especie; en la retina del mono se han descrito 9 tipos morfológicos distintos, 8 de estos tipos celulares corresponden a células bipolares para cono, mientras que sólo existe un tipo de célula bipolar para bastón (Boycott y Wässle, 1991).

Las células bipolares se subdividen en dos grupos; las que se conectan a los conos L y M y las que se conectan a los conos S. Las conectadas a los conos M o L pueden ser enanas o difusas y su conexión puede ser invaginante o superficial (Kolb *et al.*, 1981; Wässle y Boycott, 1991). Las bipolares de los conos S son de un tamaño intermedio a las anteriores y establecen uniones con los conos solo por invaginación en la sinapsis en cintilla (Kouyama y Marshak, 1992). Las bipolares de bastones se conectan con varios de ellos (20-40) por sinapsis invaginantes (Kolb *et al.*, 1981; Wässle y Boycott, 1991).

Varias células bipolares convergen hacia un número más restringido de células ganglionares, por el intermedio de células amacrinas de tipo AII, a nivel de la capa plexiforme interna (Kolb *et al.*, 1981).

Desde un punto de vista funcional, los conos L y M están conectados a un acoplamiento de células bipolares; una invaginante y una superficial que funcionan de manera opuesta en respuesta a la luz. Así las bipolares invaginantes llamadas ON están hiperpolarizadas en oscuridad y se despolarizan

con la luz y las bipolares superficiales llamadas OFF a la inversa. Esto es importante ya que reciben la misma tasa de glutamato y sin embargo tienen un comportamiento opuesto. En efecto, cuando los FR disminuyen la tasa de liberación de glutamato tras un estímulo luminoso, causan la liberación de glutamato por parte de las bipolares ON, y la inhiben por parte de las OFF. Esto ocurre porque las bipolares ON poseen receptores distintos a las OFF. Las células bipolares conectadas a los bastones y a los conos S funcionan solo bajo el modo ON (**Figura 8**) (Kolb, 2003).



El conjunto de FR unidos funcionalmente a una célula bipolar determinada constituye su **campo receptor**. La conexión puede ser directa recubriendo el campo dendrítico generando el **centro**, o indirecta por mediación de células horizontales limitando el **contorno** del campo receptor. Esta organización también se encuentra en las células ganglionares (Kolb, 2003).

1.3.3.1.2.- RECEPTORES:

Las células bipolares tienen receptores de glutamato. Se han identificado dos tipos distintos: receptores metabotrópicos y receptores ionotrópicos (Nakanishi, 1992).

1.3.3.1.1.1.- Metabotrópicos:

Son los que utilizan las células bipolares ON. Al contrario que los ionotrópicos, los canales iónicos asociados a estos receptores están acoplados a proteínas G, y utilizan segundos mensajeros (GMPc). Cuando el ligando (glutamato) se une a estos receptores activa una cascada intracelular y cierra el canal catiónico dependiente de GPMc que lleva asociado, por ello se consideran receptores inhibidores (Nakanishi, 1994).

1.3.3.1.1.- Ionotrópicos:

Son los que poseen las células bipolares OFF. Cuando el glutamato interactúa con un receptor de este tipo abre el canal iónico (muy permeable al Na^+ y al K^+) de manera directa, ya que ambos, receptor y canal forman una única estructura. Esta característica los hace ser más rápidos que los metabotrópicos (Verdoorn *et al.*, 1991). Se consideran receptores excitadores. Existen dos tipos dentro de esta clase de receptores, los de tipo NMDA y los de tipo no-NMDA. Este último es el que poseen las bipolares OFF; se trata de receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico/kainato (AMPA/KA) (Keinanen *et al.*, 1990; Nakanishi, 1992).

1.3.3.2.- CÉLULAS DE ASOCIACIÓN:

Todas las retinas de mamíferos contienen varios tipos de células de asociación lateral. A nivel de la CPE están las células horizontales, a nivel de la plexiforme interna las células amacrinas, e interconectando ambas las interplexiformes (Wässle y Boycott, 1991).

1.3.3.2.1.- CÉLULAS HORIZONTALES:

Estudios recientes, combinando microscopía óptica y electrónica con el método de Golgi, han demostrado que en la retina humana existen tres tipos de células horizontales. Las células horizontales de tipo I (HI) contactan preferentemente con conos L y M, aunque también con conos S, a través de sus dendritas y con bastones en una sinapsis invaginante a trabes de su único axón. Las células horizontales de tipo II (HII) o células horizontales con axón, contactan preferentemente con conos S pero también con otros tipos de conos a nivel de sus terminaciones dendríticas y únicamente con conos S a nivel de su axón terminal. Las células horizontales de tipo III (HIII) son semejantes a las células de tipo I, aunque de mayor tamaño y evitan cualquier contacto con conos S. Se cree que utilizan el ácido gamma amino butírico (GABA) como neurotransmisor, por lo menos las HI y las HII, y sus polos dendríticos y axónicos funcionan de manera independiente (**figura 12**) (Ahnelt y Kolb, 1994).

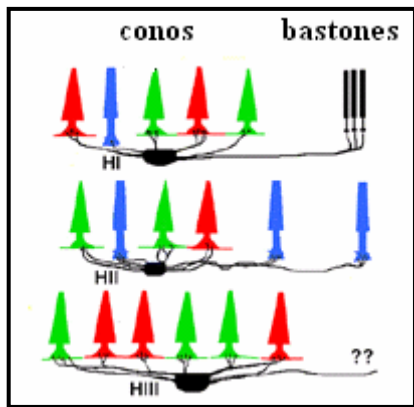


Figura 12: Distinto tipo de células horizontales y su conexión con los conos y los bastones. Los conos M, L y S se representan en color verde, rojo y azul respectivamente.

Las células horizontales responden a la luz con una hiperpolarización, pero a la vez existen sinapsis recíprocas desde las células horizontales hacia los FR. Estas sinapsis hacen que la información de las redes de células horizontales, que se encuentran extensamente acopladas a través de contactos eléctricos, realice una sumación espacial de los estímulos colaborando en la organización centro/periferia de los campos receptores de las células ganglionares (Mangel, 1991). Dichos acoplamientos por contactos eléctricos son muy sensibles a ciertos neurotransmisores, como la dopamina secretada por las células amacrinas dopaminérgicas que ejercen así un control retroactivo sobre la capa plexiforme externa (**figura 13**) (Kolb, 2003).

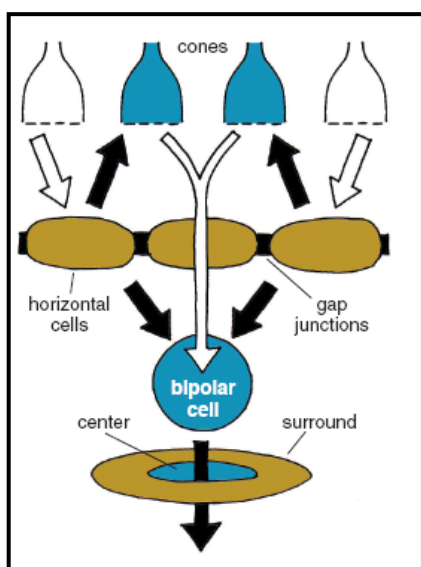


Figura 13: Las células horizontales recogen información de un amplio rango de conos, y ejercen su influencia sobre las bipolares directamente y/o por mecanismos de feed-back hacia los conos (Kolb, 2003).

1.3.3.2.2.- CÉLULAS AMACRINAS:

Estas células presentan un cuerpo celular situado en la CNI y unas prolongaciones que se extienden por la misma. No reciben conexiones directas de los FR, sino sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando

también a las células bipolares. Por tanto forman la vía de asociación lateral a nivel de la plexiforme interna (Wässle y Boycott, 1991). Están conectadas entre ellas por sinapsis químicas. Sus neurotransmisores son la glicina y el GABA, pero además liberan sustancias que pertenecen al sistema colinérgico, serotoninérgico y dopaminérgico, que funcionan como neuromoduladores (Kolb, 2003). Proporcionan una respuesta de tipo fásico, al contrario que las bipolares cuya respuesta es tónica. Gracias a la retroalimentación ejercida sobre las células bipolares, la acción excitadora sostenida de estas sobre las ganglionares es interrumpida, realizando una diferenciación temporal sobre la señal de las bipolares (Kolb *et al.*, 1981). De esta manera contribuyen a los aspectos dinámicos de las interacciones entre el centro y el contorno del campo receptor de las células ganglionares, campo receptor cuya estructura espacial fue construida por las bipolares y horizontales más externas (Kolb, 2003).

El papel de las amacrinas de tipo AII es muy importante ya que aseguran la unión entre las bipolares ON de los bastones y las ganglionares por medio de 2 sinapsis; una eléctrica a nivel de las terminaciones presinápticas de una bipolar ON de un cono, y la segunda, de tipo químico inhibitoria glicinérgica con una bipolar OFF de cono. De tal manera que las células bipolares de los bastones contribuyen a la excitación por la vía ON y a la vez a la inhibición por la vía OFF, manteniendo así bien separadas las vías ON y OFF **a pesar de que las bipolares de los bastones son solo de tipo ON (figura 14)** (Sharpe y Stockman, 1999; Kolb, 2003).

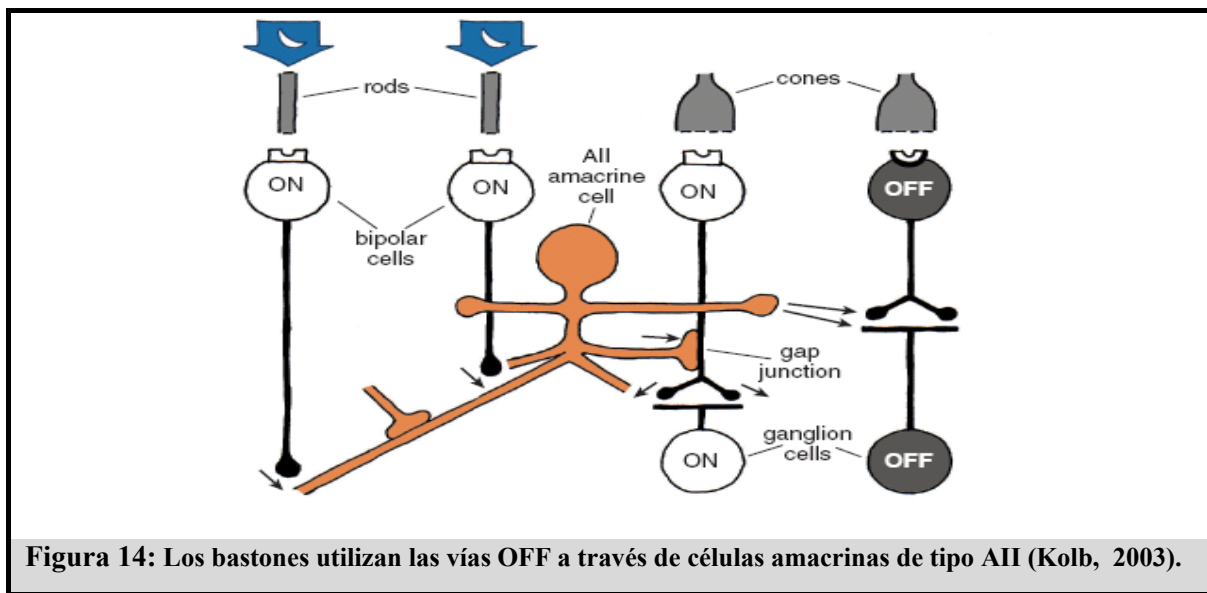


Figura 14: Los bastones utilizan las vías OFF a través de células amacrinas de tipo AII (Kolb, 2003).

1.3.3.2.3.- CÉLULAS INTERPLEXIFORMES:

Las células interplexiformes fueron descritas por primera vez por el Doctor Antonio Gallego en la retina del gato en 1971 (Gallego, 1971). Interconectan la plexiforme interna y la externa (Wässle y

Boycott, 1991). Están en contacto con las horizontales y ejercen un retrocontrol sobre la capa receptoral. Se cree que son GABAérgicas, al menos en el gato (Kolb y West, 1977).

1.3.3.3.- CÉLULAS DE SOSTÉN:

Las células de sostén son células gliales entre las que cabe destacar a las células de Müller (Wässle y Boycott, 1991). Estas, son células gliales especiales, cuyos núcleos se sitúan en la CNE y sus prolongaciones se extienden a través de todas las capas (Wässle y Boycott, 1991). Desempeñan un gran número de funciones entre las cuales destacan (Newman, 1986):

1. Absorben residuos de las células nerviosas, tales como dióxido de carbono y amoníaco, y reciclan los neurotransmisores de tipo aminoácidos que se van gastando.
2. Protegen las neuronas frente a la excesiva exposición a neurotransmisores tales como el glutamato.
3. Podrían estar implicadas en la fagocitosis de los desechos neuronales y en la liberación de sustancias neuroactivas tales como GABA, taurina y dopamina.
4. Controlan la homeostasis y protegen a las neuronas contra cambios dañinos en su ambiente iónico, captando el K^+ extracelular y redistribuyéndolo.
5. Podrían sintetizar ácido retinoico a partir del retinol (Edwards, 1994).

1.3.4.-CAPA DE LA CONDUCCIÓN:

Aquí comienza la conducción de las señales generadas en la retina para terminar en la corteza visual. En esta capa se encuentran las células ganglionares con sus axones que darán origen al NO (Wässle y Boycott, 1991).

Las células ganglionares poseen un cuerpo celular voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinapsis a nivel de CPI con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas. Su axón sólo se mieliniza a nivel del NO, por fuera ya del globo ocular. Este axón tiene un porcentaje variable de decusación en el quiasma óptico (75 % en el perro, 50 % en el mono...) (Brooks *et al.*, 1999). Del quiasma óptico llega hasta el cuerpo geniculado lateral externo, donde se produce la siguiente sinapsis de la vía visual. La información que transportan es transmitida en forma de código de frecuencias de potenciales de acción. Los potenciales de acción son descargas eléctricas de la membrana celular de gran amplitud (>100 mV) y corta duración (~ 1 ms), que pueden ser

conducidos de forma activa y a gran velocidad a lo largo del axón de las células ganglionares (Howard y Breazile, 1973).

La codificación de las formas de los estímulos visuales por la retina es posible gracias a mecanismos de inhibición lateral. En este sentido, es conocido el papel que juegan las células horizontales de la retina, modulando transversalmente el efecto que el glutamato liberado por los FR ejerce sobre las células bipolares. Gracias a estos mecanismos de inhibición lateral, las células bipolares de la retina son capaces de responder con despolarizaciones (respuesta ON) o hiperpolarizaciones (respuesta OFF) a estímulos luminosos puntuales que inciden en el centro de su campo receptor, y de forma completamente antagónica a estímulos luminosos que inciden sobre la periferia de su campo receptor (Mangel, 1991). Las células ganglionares pequeñas de la retina presentan una organización concéntrica de sus campos receptores (centro ON/periferia OFF o centro OFF/periferia ON), admitiéndose en el momento actual que dicho antagonismo centro/periferia es la base de la percepción de las formas por las células de la corteza visual (Kolb, 2003).

Las células ganglionares tienen un funcionamiento que se puede llamar digital, mientras que las células de la capa receptoral y postreceptoral tienen un funcionamiento de tipo analógico (Lazard *et al.*, 2000). Es decir, las ganglionares tienen despolarizaciones equipotenciales (de igual amplitud), pero el número de despolarizaciones por unidad de tiempo refleja la intensidad del estímulo, ya que incluso sin estimulación transmiten impulsos continuos, y las señales excitatorias incrementan el número de impulsos, mientras que las inhibidoras lo disminuyen. Así las ganglionares de centro-ON aumentan la frecuencia de descarga cuando se ilumina el centro, y reciben su estímulo de las bipolares invaginantes (ON). Las ganglionares de centro-OFF, disminuyen la frecuencia de sus descargas cuando se ilumina el centro, recibiendo su estímulo de las bipolares superficiales (OFF). Ambos tipos están presentes en igual número en la retina y la luz difusa no es un estímulo eficaz en ninguno de ellos (Kolb, 2003).

1.4.- VASCULARIZACIÓN:

La retina es extremadamente activa metabólicamente, con elevado consumo de oxígeno. Al igual que ocurre con el cerebro, la retina presenta una barrera (hemato-retiniana) altamente selectiva para mantener la regulación homeostática de su capa nerviosa (Rodríguez-Peralta, 1975). En los mamíferos se pueden encontrar retinas avasculares (algunos marsupiales) y vasculares (perro, gato, caballo...). Las retinas vasculares reciben su aporte sanguíneo por dos vías: la arteria central de la retina y los vasos coroidianos (Buttery *et al.*, 1990). En el perro así como en el hombre, la vascularización de la mayoría de la neuroretina está asegurada por la ramas de la arteria central de

la retina, que forman una amplia red capilar. Estos vasos se pueden encontrar a nivel de casi todo el espesor de la retina, desde la capa de fibras del NO hasta la CPE e incluso la CNE. La delicada capa de los FR y el EPR se nutren directamente de ramas que provienen de la arteria coriocapilar (Samuelson, 1999).

La circulación retiniana se caracteriza por su flujo más bajo en comparación con la circulación coroidiana. Esta última es controlada principalmente por innervación simpática y apenas se autoregula. La circulación retinal carece de innervación autónoma, se regula fundamentalmente por factores locales mostrando una eficiente capacidad de autorregulación (Demant *et al.*, 1982; Delaey y Van de Voorde, 2000).

2.- ELECTROFISIOLOGÍA OCULAR:

La electrofisiología ocular es la ciencia que estudia y recoge los cambios eléctricos del globo ocular y su conducción hasta el área visual occipital a través de las vías ópticas. Permite un estudio global del funcionamiento de las estructuras responsables de la información visual sensorial. La retina es considerada como una prolongación periférica del cerebro y presenta, como toda estructura nerviosa, potenciales de reposo y potenciales de acción (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002; Mora y Aregall, 2005).

El globo ocular se comporta como un dipolo eléctrico, con una diferencia de potencial entre la córnea y el polo posterior, en el caso del hombre, de unos 6 mV. Las capas externas de la retina son electro-negativas en relación a las internas que son electro-positivas. La córnea recibe el potencial positivo de las capas internas retinianas, en tanto que el entorno periocular recibe el potencial negativo de las capas externas (Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

Este potencial córneo-retiniano en reposo, sin la menor influencia de estimulación luminosa fue descubierto en 1894 por Dubois-Reymond que lo llamó potencial de reposo o potencial córneo-retiniano (Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

Por medio de esta disciplina se pueden recoger trazados que corresponderán a diversas y diferentes capas del órgano, así como a su estado, ya sea en reposo o en acción. Por lo tanto vamos a distinguir y separar para su estudio, los potenciales de reposo y de acción de la retina, que se van a generar en diferentes capas de la misma (Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002; Ofri, 2002; Mora y Aregall, 2005).

- Potencial de reposo de la retina: electro-oculograma (EOG).

- Potenciales de acción: electroretinograma de pleno campo a flash (ERG-flash), potencial de recepción precoz (PRP), pattern-electroretinograma (PERG), electroretinograma focal y multifocal (fERG y mfERG).
- Potenciales evocados visuales (PEV).

2.1.- POTENCIAL DE REPOSO DE LA RETINA:

2.1.1.- ELECTRO-OCULOGRAMA (EOG):

El EOG es la medida de la variación del potencial de reposo que existe entre la córnea y el polo posterior del globo ocular. Este potencial de reposo varía bajo el efecto de la incidencia luminosa sobre la retina, variación que se puede evidenciar mediante **movimientos oculares**, ya que dicho potencial es perpendicular a la superficie de la córnea lo que hace imposible su registro estático (Marmor, 1998). En 1962 Arden observó que la información más importante se obtenía por una comparación de las amplitudes, bajo la situación de iluminación y de oscuridad, expresándose este test como cociente de Arden. A partir de este momento se introduce en la clínica para medir indirectamente el aumento del potencial de reposo como indicador de la función del EPR, es decir el estado funcional de la unión de este epitelio con el artículo externo de los FR (Arden *et al.*, 1962).

2.1.1.1.- ORIGEN DE LAS ONDAS:

Cuando un ojo adaptado a la oscuridad se expone a un estímulo luminoso de larga duración y de nivel fotópico se observan una larga secuencia de respuestas electrofisiológicas reproducibles. En oscuridad los FR se encuentran despolarizados, el EPR de la retina tiene un potencial estable llamado de referencia, las células bipolares adyacentes a los FR se encuentran según su naturaleza, despolarizadas (bipolares OFF) o hiperpolarizadas (bipolares ON), y las células ganglionares presentan un ritmo de descarga aleatorio de sus potenciales de acción (Lazard *et al.*, 2000; Kolb, 2003).

Cuando se establece un estímulo luminoso la primera de esas respuestas es el potencial de recepción precoz (PRP). Es muy temprana (entre 1 y 3 ms) y es consecuencia de cambios físicos en las moléculas de fotopigmentos (Murakami y Pak, 1970; Walther y Hellner, 1986). La segunda aparece entre 10 y 20 ms tras el inicio del estímulo; se trata del electroretinograma (ERG) (Noell, 1954). Unos 10 segundos después, aparece la *onda c* generada principalmente por el EPR (Steinberg *et al.*, 1970). Si el estímulo luminoso persiste, encontramos una oscilación rápida al final

de la *onda c*, seguida tras 5 o 10 minutos por el **“light peak”**, variación máxima del potencial de referencia del EPR a un estímulo luminoso, registrado a nivel clínico por el EOG (Linsenmeier y Steinberg, 1984a; Marmor, 1998). Si persiste el estímulo, el potencial de referencia presenta oscilaciones cada 24 minutos, de amplitud decreciente que se acaban anulando a las dos horas (Lazard *et al.*, 2000).

La explicación iónica de estas variaciones en el potencial de referencia a lo largo de una exposición larga a la luz se conoce bien. Los iones de K^+ juegan un papel importante. En oscuridad, la concentración de K^+ es muy alta en el espacio subretiniano y desde el inicio del estímulo luminoso va disminuyendo (Griff y Steinberg, 1984). Los FR activados por los fotones se hiperpolarizan (fototransducción), disminuye la salida de K^+ mientras que la bomba de Na^+/K^+ sigue funcionando (Oakley 2nd, 1977). Esto conlleva una caída brutal de K^+ en el espacio subretiniano que genera la *onda c* del ERG cuando el registro se realiza durante al menos 5 segundos con estímulo luminoso continuo (Oakley y Green, 1976). Debido a esa disminución de K^+ la membrana apical del EPR se hiperpolariza a los 4 segundos seguido de una hiperpolarización de la membrana basal por disminución de la permeabilidad de los canales de Cl^- desde el segundo 20 (Gallemore, 1993). Si la iluminación persiste al menos 5 minutos aparece la despolarización de la membrana basal provocada por la intervención de dos mensajeros; la epinefrina, que aparece en el espacio subretiniano y se fija a la membrana apical, y otro mensajero intracelular que interviene junto con los iones de Ca^{2+} haciendo aumentar la permeabilidad de los canales de Cl^- (Edelman y Miller, 1991). Esto conlleva a una despolarización tardía de la membrana basal hasta un valor llamado **“light peak” (LP)**, seguido de una repolarización progresiva hasta un valor estable a las dos horas de iluminación (Gallemore, 1993; Lazard *et al.*, 2000).

Todos estos fenómenos han sido perfectamente estudiados en el gato y encontrados también en el hombre. Al cese de la estimulación los pigmentos de los conos y bastones se regeneran por mediación del EPR (Crouch *et al.*, 1996). Se observa una disminución de la diferencia de potencial córneo-retiniano que alcanza su valor mínimo conocido como **“dark trough” (DT)**, entorno al minuto 10, aumentando de nuevo y estabilizándose hacia el minuto 15 (Lessel *et al.*, 1993).

2.1.1.2.- CARACTERÍSTICAS:

El EOG se caracteriza por tres valores correspondientes a tres fases de adaptación retiniana. El valor inicial (VI) es un reflejo del potencial córneo-retiniano medido en ambiente fotópico moderado. La depresión en oscuridad o DT, es el valor mínimo del potencial córneo-retiniano entorno al minuto 10 de adaptación a la oscuridad y que suele ser un 30 % menor al VI. El pico de

iluminación (LP) representa el valor máximo de potencial córneo-retiniano hacia el minuto 8 de adaptación a la luz. De esta forma se calcula el cociente de Arden ($(LP/DT) \times 100$), cuyo valor es normalmente superior a 180 (**figura 15**). También se estudian las variaciones relativas del DT y del LP con respecto al VI (Arden *et al.*, 1962; Marmor, 1998; Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

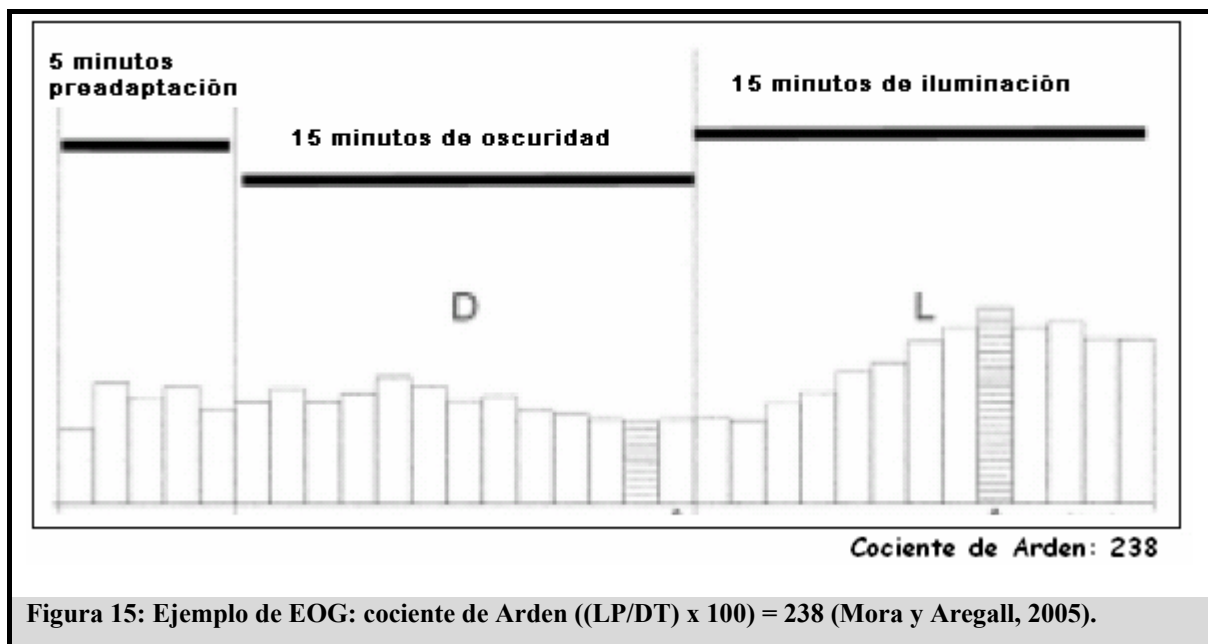


Figura 15: Ejemplo de EOG: cociente de Arden $((LP/DT) \times 100) = 238$ (Mora y Aregall, 2005).

El DT es insensible a la luz, únicamente depende de la integridad del EPR para nada de la de los FR. El LP es el componente sensible a la luz y está generado por la despolarización de la membrana basal del EPR. Esta respuesta necesita del acoplamiento FR-EPR y refleja su actividad. En medicina humana se utiliza fundamentalmente para confirmar o descartar la enfermedad de Best (distrofia macular viteliforme de Best). En esta patología hay una sustancial disminución del cociente de Arden en pacientes ya diagnosticados, pero también en portadores sin lesiones oftalmoscópicas visibles (Theischen, 1997). También es útil para monitorizar el daño retiniano tras la obstrucción de la vena central de la retina (Papakostopoulos *et al.*, 1992).

Es una prueba relativamente sencilla cuando los pacientes cooperan. En los animales es muy difícil de realizar, ya que se debe hacer bajo anestesia general y requiere movilizar los ojos de manera artificial. No es un examen ejecutable en la clínica veterinaria habitual, pero según Kommonen *et al.*, cuando se realiza se encuentran resultados similares a los que se registran en el hombre (Kommonen *et al.*, 1991).

En veterinaria una aproximación indirecta al funcionamiento del EPR es posible gracias al adaptoretinograma (AERG). El AERG es un estudio dinámico de la adaptación de la retina a la oscuridad efectuándose conjuntamente con el EPR y puesta de manifiesto mediante el ERG. Es un

examen fácil de llevar a cabo en la clínica cotidiana y adaptable a todas las especies incluida la humana (Rosolen *et al.*, 1997; Rosolen y Lazard, 1997; Lazard *et al.*, 2000).

2.2.- POTENCIALES DE ACCIÓN DE LA RETINA:

Los potenciales de acción global de la retina son inducidos por un estímulo luminoso simple en el caso del electroretinograma (ERG) y del potencial de recepción precoz (PRP) o por estímulos estructurados en el caso del electroretinograma a patrón o pattern electroretinograma (PERG) (Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

A efectos teóricos podemos incluir el PRP dentro del ERG ya que es la primera respuesta de la retina a una estimulación luminosa y precede al propio ERG (Walther y Hellner, 1986).

2.2.1.- EL ELECTORRETINOGRAMA (ERG):

2.2.1.1.- HISTORIA:

Los primeros ERGs fueron recogidos en ojos de rana por Holmgren en 1865. Pocos años después Dewar observó que los ojos de rana expuestos a la luz provocaban ligeros movimientos en la aguja de un galvanómetro, sugiriendo que existía un cambio eléctrico positivo de la córnea con respecto al fondo del ojo (De Rouck, 1991).

En 1903, Gotch por primera vez, afirma que la respuesta del ojo a un flash luminoso consiste en dos ondas: primero la córnea se torna negativa y después aparece una onda positiva de mayor amplitud (Gotch, 1903). Unos años más tarde Einthoven y Jolly dividieron las respuestas electroretinográficas en tres ondas. La primera onda aparece justo después de iniciado el estímulo luminoso siendo una onda negativa, es seguida por una onda positiva y finalmente aparece una onda tardía también positiva. Einthoven y Jolly sugirieron que cada una de estas ondas sería indicativa de algún cambio celular en la retina y sus trabajos en este campo sentaron algunas de las bases para el análisis del ERG que aún se utilizan hoy día (Einthoven y Jolly, 1908).

En 1911, Piper presentó su análisis del ERG. Dividió el ERG en tres componentes: I, II y III. Contrariamente a Einthoven y Jolly que sugirieron que las ondas del ERG reflejaban procesos químicos transitorios en la retina, Piper propuso que los componentes del ERG duraban mientras durase el estímulo luminoso. Según Piper, las primeras 2 ondas, I y II, se caracterizan por tener distintas latencias y propiedades y su interacción resulta en la formación de las ondas a y b. La onda III sería equivalente a la *onda c*. Aunque el análisis de Piper era puramente especulativo y basado en unos pocos hechos, su interpretación junto con la de Einthoven y Jolly sentaron las bases

para comprender que el ERG es el resultado de unos pocos componentes (Einthoven y Jolly, 1908; Noell, 1954; De Rouck, 1991).

En 1933, Ragnar Granit publicó un estudio más detallado sobre los componentes del ERG del gato. Hizo registros en gatos anestesiados con éter utilizando electrodos corneales observando la progresiva desaparición de los componentes del ERG a medida que iba profundizando la anestesia. Granit llamó a los distintos componentes PI, PII y PIII (**figura 16**) por orden de su desaparición en función de la profundidad anestésica. El PI, primero en desaparecer, es una onda tardía y positiva que solo se registra si el estímulo es duradero. PII es también una onda positiva que alcanza relativamente rápido su pico y luego se mantiene en un potencial intermedio mientras dura el estímulo. El último componente, PIII, es el más resistente al plano anestésico; se trata de una onda negativa que aparece más rápido que las otras dos y que permanece como un potencial negativo mientras dura el estímulo (Granit, 1933). El análisis de los componentes del ERG de Granit ha sido ligeramente modificado a lo largo de los años, pero sigue siendo una buena base para la interpretación del ERG. Granit fue galardonado en 1954 con el premio Nobel de Medicina y Fisiología por sus trabajos sobre electrorretinografía. De su análisis se sabe que la *onda a* se corresponde con el componente negativo PIII, la *onda b* refleja la sumación de PII y PIII mientras que la tardía onda c es la sumación de PI y PIII (Lazard *et al.*, 2000).

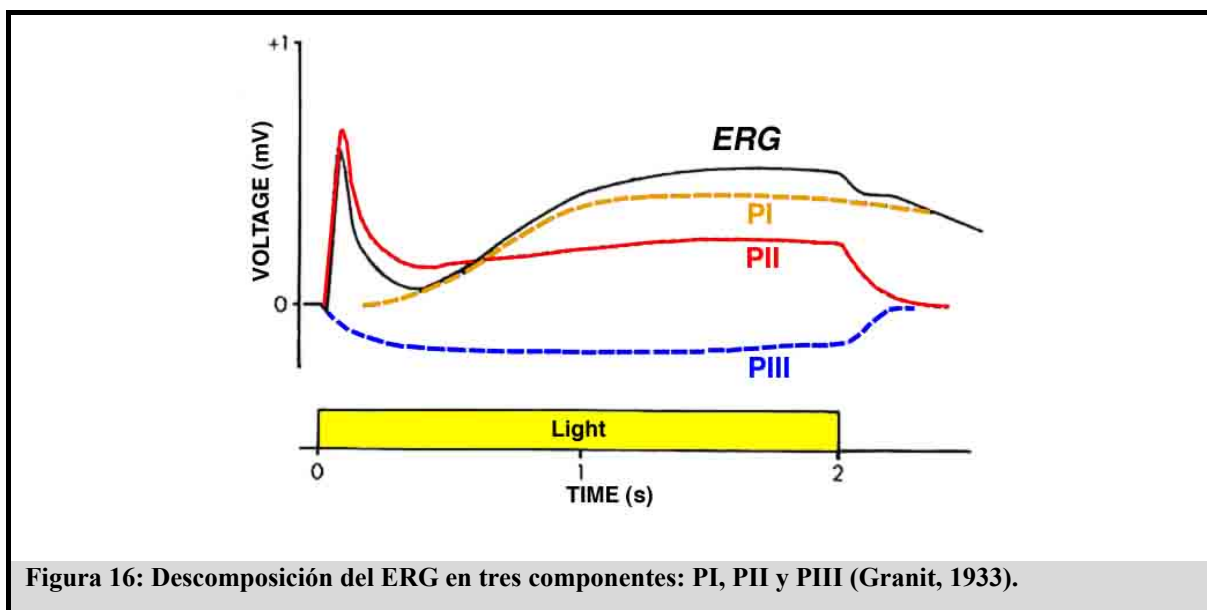


Figura 16: Descomposición del ERG en tres componentes: PI, PII y PIII (Granit, 1933).

2.2.1.2.- BASES ELÉCTRICAS:

El ERG se registra mediante un electrodo extracelular activo posicionado en la córnea, en el humor vítreo o a distintos niveles en el interior de la retina. El registro extracelular de la actividad eléctrica

de tejidos vivos es posible cuando las corrientes eléctricas se propagan a través de una matriz extracelular con resistencia eléctrica (Noell, 1954; Brown, 1968).

En la retina de los vertebrados, los FR están dispuestos en paralelo por lo tanto su flujo de corriente se suma y difunde también en paralelo dando lugar a una fuerte corriente extracelular radial desde la capa nuclear interna hacia el EPR. De igual forma las corrientes extracelulares del resto de células de la retina se suman si se dirigen radialmente. Por lo contrario las corrientes laterales se anulan ya que la disposición de la retina es totalmente simétrica. Por lo tanto cuando un estímulo luminoso homogéneo alcanza toda la retina, solamente se forman las corrientes extracelulares radiales. Estas corrientes fluyen a través de distintas vías. Podemos hablar de dos rutas principales: una ruta local (A) y una ruta remota (B) (**figura 17**) (Brindley, 1956).

En la ruta A, la corriente permanece dentro de la retina, mientras que la corriente que fluye por la ruta B abandona la retina a través del humor acuoso y del segmento anterior del ojo volviendo a la retina a través de la esclera, la coroides y el EPR. La corriente inducida por estímulos luminosos que fluye por la vía B (remota) puede ser registrada de manera no invasiva con electrodos extra-oculares (Brindley, 1956; Brown, 1968).

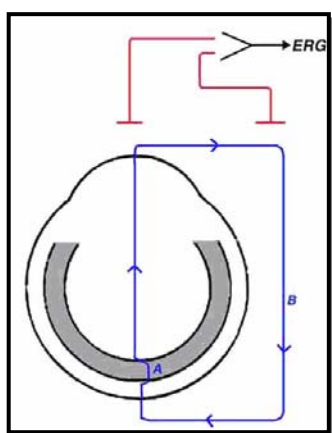


Figura 17: Rutas local (A) y remota (B) que siguen las corrientes extracelulares generadas en la retina.

La ley de Ohm dice que cuando una corriente eléctrica fluye a través de una resistencia, se forma una diferencia de potencial (V) que es igual al producto de la intensidad (I) por la resistencia (R): $V = I \times R$. Aplicando esta ley se extrae la relación entre las corrientes I_A e I_B , las resistencias de los tejidos oculares y las diferencias de potenciales (Honsho *et al.*, 2004).

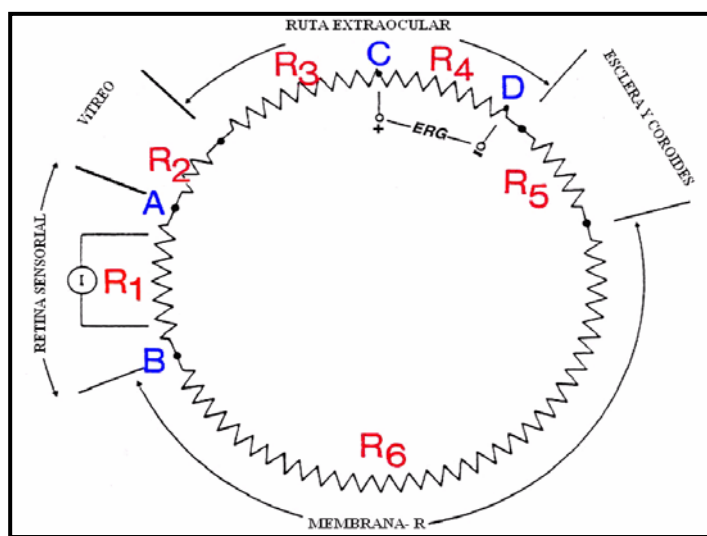


Figura 18: Resistencias eléctricas de los distintos tejidos oculares. C y D representan los puntos de localización de electrodos para registrar el ERG extrarretinal.

Un estímulo luminoso mediante un proceso electroquímico denominado fototransducción genera una corriente extracelular (I) que se divide en dos rutas: una que fluye a través de la retina (ruta local IA) y otra que fluye a través de los tejidos oculares (ruta remota IB). Cada uno de los tejidos oculares (retina, vítreo, esclera, coroides, EPR) se representa en la **figura 18** como resistencias eléctricas (R) (Brindley, 1963).

Según la ley de Ohm la diferencia de potencial entre dos puntos es independiente de la ruta seguida por la corriente. Por lo tanto la diferencia de potencial entre los puntos A y B puede ser calculada para la ruta local o la remota (Honsho *et al.*, 2004).

$$I_A R_1 = I_B (R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6) \text{ (Ecuación 1)}$$

De esto se puede deducir que la corriente IA en la ruta local es mayor a la corriente IB en la ruta remota ya que la suma de resistencias $R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6$ es lógicamente mayor que R_1 . Cuando utilizamos dos electrodos para registrar la actividad eléctrica de la retina en respuesta a estímulos luminosos obtendremos los mayores cambios de potencial cuando los electrodos se coloquen entre los puntos A y B, es decir a ambos lados de las células que producen la respuesta eléctrica (Brown y Wiesel, 1961a; 1961b).

Evidentemente cuando el ERG se registra en humanos o en animales de manera repetida los electrodos no se pueden colocar en la retina. La alternativa es colocar tanto el electrodo activo como el de referencia lejos de la misma. Si dichos electrodos se colocan en el lugar señalado en la **figura 18** como C y D la diferencia de potencial entre ellos se obtiene de las siguientes ecuaciones:

$$V_C - V_D = I_B \times R_4 \text{ (Ecuación 2)}$$

$$V_C - V_D = I_A R_1 - I_B (R_2 + R_3 + R_5 + R_6) \text{ (Ecuación 3)}$$

Esto es el ERG: el cambio de potencial inducido por un estímulo luminoso relacionado con la actividad eléctrica de la retina en respuesta a la luz. Por norma general cuando la función retiniana se deteriora, la actividad eléctrica en respuesta a la luz disminuye. Las corrientes I_A e I_B serán más pequeñas y en consecuencia el ERG también indicando que existe una patología retiniana (Brown, 1968).

Hay que tener en cuenta que la magnitud de las resistencias de los distintos tejidos oculares y más aún la relación entre ellas también puede afectar al ERG medido con electrodos extraoculares. En este sentido, según Wali y Leguire, los pacientes con el fondo de ojo más pigmentado tienen respuestas menores en el ERG bajo ciertas condiciones, debido a la resistencia de los gránulos de melanina (Wali y Leguire, 1993). En efecto, la relación entre la corriente originada de la actividad eléctrica de la retina en respuesta a la luz en las rutas local y remota depende de la relación entre las resistencias de ambas rutas. De la ecuación 1 se extrae la siguiente relación:

$$I_A/I_B = (R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6)/ R_1 \text{ (Ecuación 4)}$$

Cualquier cambio en las resistencias de los tejidos oculares va a cambiar la magnitud de la corriente en la ruta remota (I_B) y el ERG ($V_C - V_D$) se va a modificar independientemente de la funcionalidad de la retina. Por lo tanto, el conocimiento de las distintas resistencias y la comprensión de los factores que las pueden modificar es importante para utilizar correctamente el ERG tanto en clínica como en investigación. El EPR ofrece la mayor resistencia (**R_6 en la figura 18**) al paso de la corriente a través de los tejidos oculares debido a la membrana de Bruch, (Tomita *et al.*, 1960) o a la membrana limitante externa (Brindley, 1956), con lo que cualquier cambio en esa resistencia afectará a la distribución de las corrientes entre la ruta local (I_A) y la ruta remota (I_B). Este cambio en las resistencias tisulares se reflejará en el ERG medido con electrodos extraoculares (Brindley, 1956; Tomita *et al.*, 1960; Byzov, 1968).

Arden y Brown resaltaron en 1965 la importancia de las resistencias de los tejidos oculares. En su experimento sustituyeron el humor vítreo de varios gatos por aceite pesado para abolir el flujo de corriente desde la retina a tejidos lejanos (ruta remota) y asegurar así mayores registros de

potenciales en la retina (ruta local) (Arden y Brown, 1965). Esto está igualmente documentado a nivel clínico, en pacientes que tras una lesión extensa de la retina se sometieron a una vitrectomía con inyección de silicona en el vítreo. Puesto que el aceite de silicona no conduce la corriente, la resistencia del vítreo aumenta y disminuye la corriente remota (IB) y el ERG (Doslak, 1988).

2.2.1.3.- ORIGEN DE LAS PRINCIPALES ONDAS:

Este apartado se puede abordar fundamentalmente desde dos puntos de vista; uno farmacológico y otro fisiológico. Los experimentos fisiológicos se basan en la asunción de que los generadores de los distintos componentes del ERG se encuentran en capas concretas de la retina y en consecuencia cuando estos son registrados con un microelectrodo en la retina distal, la polaridad de las ondas específicas del ERG se invertirá con respecto a las ondas obtenidas colocando el electrodo activo en la retina proximal, el vítreo o la córnea (Green y Kapousta-Bruneau, 1999). Otro tipo de experimentos fisiológicos son los basados en el análisis de densidad y origen de corrientes con microelectrodos introducidos en distintas capas de la retina (Karwoski y Xu, 1999). Desde el punto de vista farmacológico, se utilizan agonistas y antagonistas específicos y se analizan sus efectos sobre el ERG (Narahashi, 1974; Green y Kapousta-Bruneau, 1999).

Los fármacos más utilizados para aislar la respuesta de uno a varios grupos celulares son los que siguen:

- El ácido DL-2-amino-4-fosfonobutírico (APB) que bloquea la actividad postreceptoral de las vías ON. Se trata de un agonista competitivo de los receptores de glutamato (neurotransmisor de los FR) que normalmente conducen las señales visuales hacia las células bipolares despolarizantes (bipolares ON). En presencia de APB esa sinapsis está constantemente activada simulando una situación de constante oscuridad. También bloquean las células horizontales (Slaughter y Miller, 1981).
- El cis-2,3-piperidinedicarboxílico (PDA), que bloquea la actividad postreceptoral de las vías OFF. Es un aminoácido excitador que bloquea el flujo desde los FR hacia las células bipolares hiperpolarizantes bloqueando también la actividad de las células horizontales. En presencia de PDA las células horizontales y las bipolares OFF no responden a la luz (Slaughter y Miller, 1983a).
- El 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), un antagonista específico de los receptores de glutamato de tipo no-NMDA (AMPA/KA) (Andreasen *et al.*, 1989; Robson y Frishman, 1996), receptores presentes en las células bipolares OFF (Keinanen *et al.*, 1990; Nakanishi, 1992).

- EL aspartato (ASP) es un análogo del glutamato que inhibe su recaptación, con lo que aumenta en la sinapsis y simula una situación de constante oscuridad (Xu *et al.*, 1991).
- El tetrodotoxina (TTX) bloquea los canales de sodio y evita los potenciales de acción generados en las células ganglionares y algunas amacrinas (Narahashi *et al.*, 1964).
- El n-metil-D-aspartato NMDA suprime la transmisión sináptica de la subclase NMDA de receptores de glutamato localizada sobre todo en células de tercer orden (ganglionares y amacrinas) (Slaughter y Miller, 1983b; Nakazawa *et al.*, 2005).
- Los iones de bario (Ba^{2+}) bloquean la conductancia al K^+ de las células de Müller (Newman, 1989).
- Ácido kinurénico (KYN) bloquea la actividad de neuronas de tercer orden; amacrinas y ganglionares (Coleman, 1986).

Los ERGs obtenidos en diferentes especies son claramente diferentes en amplitud, latencia y forma debido a diferencias propias de la especie, en particular a la distinta densidad de conos y de bastones en sus retinas, pero también son distintos debido a factores técnicos como la duración e intensidad del estímulo y el método de recogida de las respuestas. Sin embargo, en la mayoría de los vertebrados los ERGs conservan la misma forma básica de sus ondas *a* y *b* (**figura 19**) (Noell, 1954; Komaromy *et al.*, 1998; Sims, 1999; Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

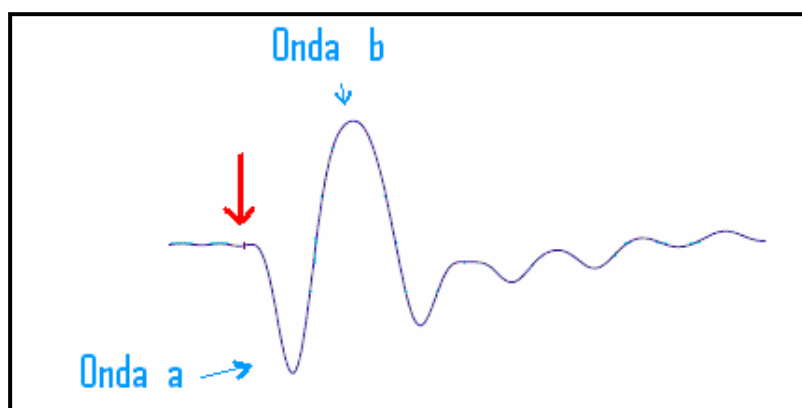


Figura 19: Forma básica del ERG, con sus ondas a y b. La flecha roja representa el inicio del estímulo.

A continuación describiremos los orígenes de las ondas *a*, *b* y *c* no por su orden de aparición en el ERG (latencia), sino por su lugar de origen en la retina comenzando por su capa más distal; el EPR, lugar en donde se origina la onda *c* (Steinberg *et al.*, 1970).

2.2.1.3.1.- ONDA c:

Hoy en día se sabe que la *onda c* se origina en el EPR. Los primeros indicios de esto fueron documentados por Noell en 1954 cuando comprobó que una inyección sistémica de ázida sódica (N_3Na) inducía un potencial eléctrico en la retina similar a la *onda c* del ERG. Este potencial no se veía alterado por el ácido iodoacético, el cual destruye los FR, ni por la sección del nervio óptico con la consiguiente destrucción de las células ganglionares (Noell, 1954). Esta hipótesis sobre el origen de la onda c fue confirmada años más tarde cuando se hicieron registros intracelulares del EPR y se vio que en respuesta a la luz se obtenía una onda con idéntica forma y temporalidad que la onda c (Steinberg *et al.*, 1970). Además, cuando la retina es separada del EPR solo proporciona ERGs con ondas a y b normales pero sin onda c (figura 20) (Pepperberg *et al.*, 1978).

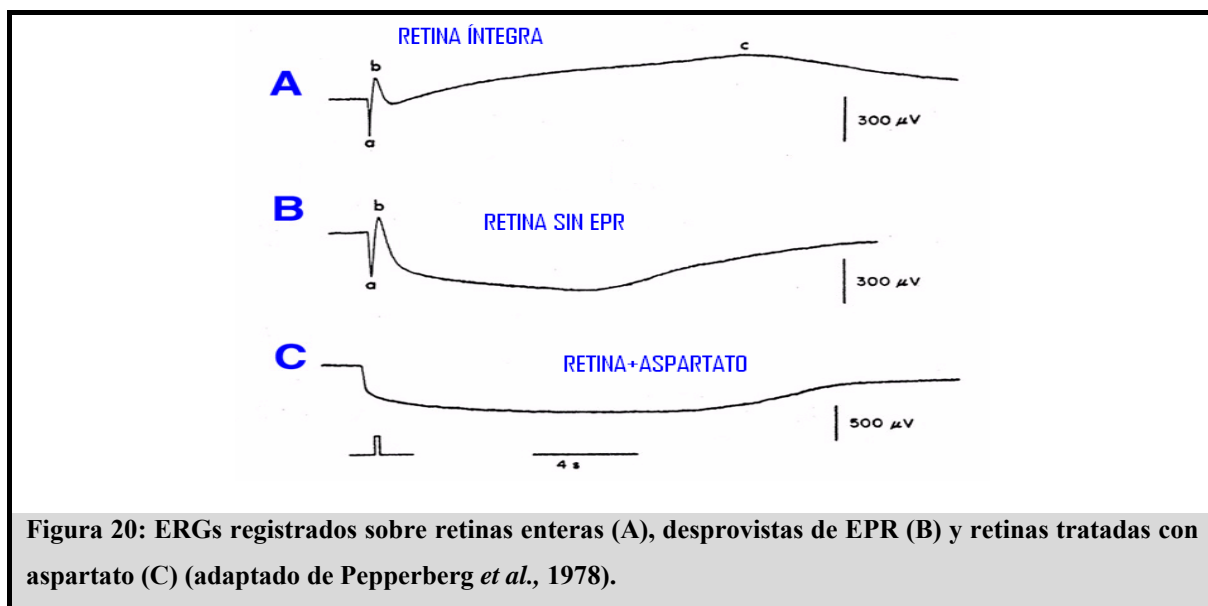


Figura 20: ERGs registrados sobre retinas enteras (A), desprovistas de EPR (B) y retinas tratadas con aspartato (C) (adaptado de Pepperberg *et al.*, 1978).

El mecanismo exacto por el cual las células del EPR generan la *onda c* se conoció cuando se desarrollaron los microelectrodos sensibles al K^+ . Las células del EPR son funcionalmente asimétricas, con su membrana basal (hacia la coroides) menos permeable a los iones de K^+ que su membrana apical (hacia la retina). Dicha asimetría causa un potencial constante entre la retina y la coroides con la parte retinal positiva con respecto a la coroidal, esto se conoce como el potencial de reposo del ojo (Arden *et al.*, 1962; Marmor, 1991; Kommonen *et al.*, 1991). El potencial de reposo es muy sensible a la concentración de K^+ y cualquier cambio en su concentración a uno u otro lado implicará un cambio en el potencial trans-epitelial. Medidas con microelectrodos sensibles al K^+ en la capa de los FR muestran una disminución de la concentración extracelular de K^+ en respuesta a estímulos luminosos, debida a la actividad inducida por la luz en los conos y bastones (Steinberg, 1985). Esta reducción de K^+ cerca de la membrana apical de las células del EPR se expresa como

un incremento del potencial trans-epitelial con el borde apical volviéndose más positivo con relación al borde coroidal. Esto es la *onda c* del ERG cuando se registra con un electrodo corneal (Oakley y Green, 1976; Oakley 2nd, 1977).

A pesar de que la *onda c* se origina en el EPR, depende directamente de la integridad de los FR ya que es la absorción de luz por parte de estos la que dispara la cadena de eventos que termina con el descenso en la concentración extracelular de K^+ (Oakley 2nd, 1977). Por lo tanto la *onda c* del ERG puede ser utilizada para evaluar la función del EPR, de los FR y de las interacciones entre ambos (Steinberg *et al.*, 1970).

Para registrar la *onda c* se necesita aplicar un estímulo largo y realizar las mediciones en corriente continua, apareciendo dicha onda entorno al cuarto segundo de iluminación. En la práctica este tipo de registros con estímulos largos son delicados en su realización y son mucho más comunes los registros de ERGs con estímulos luminosos breves (flash), de entre 1 y 10 ms (Marmor *et al.*, 2004), en los que no se registra la *onda c* (Steinberg *et al.*, 1970).

2.2.1.3.2.- ONDA a:

La *onda a* del ERG se corresponde con el componente PIII de Granit. Hoy se sabe que el componente PIII se divide en otros dos un PIII rápido y un PIII lento (Murakami y Kaneko, 1966). El estudio desde un punto de vista farmacológico del origen de la *onda a* fue posible cuando se identificó el neurotransmisor liberado por los FR; el glutamato (Massey, 1990). Exponiendo la retina a sus agonistas y antagonistas se puede imitar o bloquear la transmisión sináptica y aislar e identificar la contribución de los FR al ERG (Bush y Sieving, 1996; Kondo y Sieving, 2001). En este sentido, fue común el uso de ASP, un aminoácido excitador (Xu *et al.*, 1991). En la **figura 20** podemos observar en el último trazado el ERG obtenido con estímulos intensos tras el uso de ASP en el que desaparece el componente PII (*onda b*) quedando solo el PIII rápido (*onda a*) (Pepperberg *et al.*, 1978). Este estudio refleja que la *onda a* (componente PIII rápido) se corresponde con la respuesta a la luz de los FR (Pepperberg *et al.*, 1978).

Más recientemente se usaron nuevos fármacos como el APB y el PDA que al igual que el ASP aíslan la respuesta de los FR bloqueando su sinapsis con células de segundo orden pero son fármacos menos tóxicos que este último (Xu *et al.*, 1991; Bush y Sieving, 1996; Kondo y Sieving, 2001). Al utilizar PDA (bloquea las células bipolares OFF y las células horizontales) la *onda b* aumenta y desaparece la *onda a* (**figura 21**).

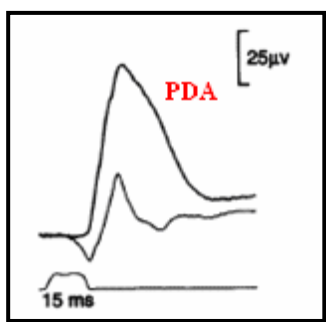


Figura 21: ERG obtenido en condiciones normales (trazado inferior) y tras aplicar PDA (trazado superior). Con PDA desaparece la *onda a* y aumenta la amplitud de la *onda b* (Bush y Sieving, 1996).

Los autores explican la ausencia de *onda a* debido a la pérdida de contribución del potencial negativo corneal que aportan las células horizontales y bipolares OFF (ambas bloqueadas por el PDA). El uso de APB, elimina la *onda b* pero no tiene efectos sobre la *onda a*. Por otro lado y acorde con esto último, la pérdida de *onda a* ha sido relacionada con el uso de estímulos cercanos al umbral de estimulación (muy usados en la clínica habitual) de los conos ya que estos estímulos bajos forman una *onda a* en la que participan células postsinápticas (bipolares OFF, horizontales). El componente mayoritario de la *onda a* corresponde principalmente a los conos cuanto más intenso es el estímulo utilizado (figura 22) (Bush y Sieving, 1994).

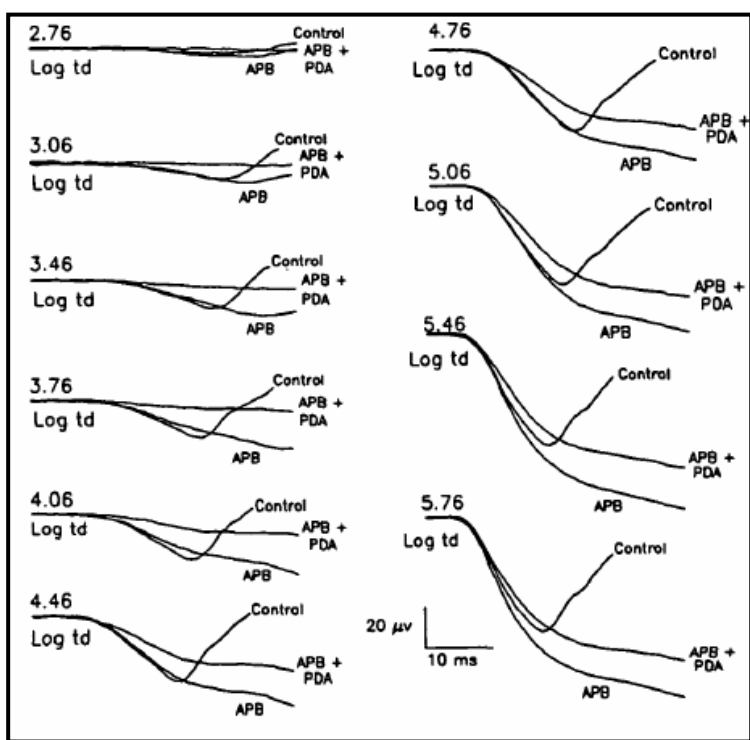


Figura 22: *Onda a* del ERG obtenida con distintas intensidades de estímulo en condiciones normales, y tras tratar la retina con APB o con la combinación de APB y PDA. Con estímulos débiles e intermedios, el APB y el PDA eliminan la *onda a* (Bush y Sieving, 1994).

Este hecho ha sido confirmado recientemente en monos (Robson *et al.*, 2003; Ueno *et al.*, 2004) gatos (Robson y Frishman, 1996) y en el hombre (Friedburg *et al.*, 2004). Por otra parte,

actualmente se asume que únicamente los primeros 10-12 ms de la *onda a* se corresponden con la actividad de los FR, en el hombre (Marmor *et al.*, 2004).

El componente lento de PIII no se puede identificar en un ERG convencional debido a la gran amplitud de PI (*onda c*), no obstante al separar la retina de su EPR y exponerla a fármacos como el ASP o la combinación de APB y PDA, se puede aislar y estudiar el componente PIII lento (**figura 20**) (Witkovsky *et al.*, 1975; Pepperberg *et al.*, 1978; Bush y Sieving, 1994). Las células de Müller son muy permeables al K^+ y una reducción en su concentración en la capa de los FR tras un estímulo luminoso induce cambios en el potencial de membrana de las células de Müller que se expresa como el componente lento del PIII del ERG (Karwosky y Proenza, 1977).

En resumen, la *onda a* es una onda negativa que refleja la hiperpolarización de los FR, tanto los conos como los bastones, con participación de células horizontales y bipolares OFF. Frente a estímulos intensos la respuesta está dominada por los FR y frente a estímulos bajos la respuesta está dominada por las células horizontales y bipolares OFF (Bush y Sieving, 1994, 1996; Robson *et al.*, 2003; Ueno *et al.*, 2004). Además la actividad de los FR se ve reflejada en la *onda a*, únicamente en sus 10-12 primeros ms (Marmor *et al.*, 2004).

Tras determinadas condiciones de adaptación larga a la oscuridad y si el tipo de estímulo activa tanto a los conos como a los bastones, se puede distinguir debido a su distinta cinética una *onda a1* y otra *a2* unos ms después, correspondientes a los conos y a los bastones respectivamente (Benítez del Castillo *et al.*, 2002). Casi siempre estas dos ondas se solapan particularmente en el perro cuyos conos son menos sensibles a la luz que los del hombre (Lazard *et al.*, 2000).

2.2.1.3.3.- ONDA b:

La *onda b* del ERG ha sido y sigue siendo muy estudiada debido a que es el componente mayor del ERG humano y de la mayoría de los vertebrados. Se origina en células retinianas post-sinápticas a los FR. En efecto, al bloquear la transmisión sináptica entre los FR y las células retinianas saturando los receptores post-sinápticos con ASP (**figura 20**) o APB, se elimina la *onda b* del ERG (Pepperberg *et al.*, 1978; Bush y Sieving, 1994, 1996; Ueno *et al.*, 2004) y se aísla el componente PIII (Karwosky y Proenza, 1977).

La *onda b* también se elimina cuando el flujo sanguíneo en la arteria retiniana central se bloquea, debido a que la neuroretina esta irrigada por la vascularización retiniana, mientras que los FR se nutren de los vasos de la coroides (Nilsson, 1971; Delaey y Van De Voorde, 2000).

Faber fue el primero en 1969 en hallar las corrientes extracelulares que originan la *onda b* del ERG del conejo. Señaló que la fuente se encontraba en la retina distal, concretamente en la capa

plexiforme externa, mientras que el origen se distribuía proximal y distal a la fuente. Las únicas células de la retina que tienen una distribución espacial que justifiquen este hallazgo son las células de Müller (atraviesan toda la retina). Basados en estas y otras observaciones, Miller y Dowling sugieren que la despolarización de las células de Müller en la retina distal da como resultado corrientes extracelulares que se expresan en el ERG como la *onda b* (Miller y Dowling, 1970).

Cambios en la concentración de iones permeables a las células de Müller son susceptibles de producir un cambio en el potencial de membrana, hablamos sobretodo de los iones de K^+ (Miller, 1973). La idea de que la *onda b* resulta de cambios en el potencial de membrana de las células de Müller debido a cambios en la concentración extracelular de K^+ inducidos por la luz, sentó la base de **la hipótesis de las células de Müller (Figura 24)** (Miller y Dowling, 1970; Miller, 1973; Karwoski y Proenza, 1977; Kline *et al.*, 1978; Newman, 1980).

Desde que surgió esta idea, numerosos investigadores han realizado registros intracelulares de las células de Müller, midiendo concentraciones extracelulares de K^+ y registros de ERGs en distintas capas de la retina en varias especies animales (Newman y Odette, 1984; Karwoski y Xu, 1999). Estos y otros estudios confirman que existe un aumento inducido por la luz en la concentración de K^+ extracelular en las capas plexiformes externas e internas (Karwoski *et al.*, 1985; Frishman y Steinberg, 1989) y un descenso como vimos antes en proximidad a los FR (**figura 23**) (Kline *et al.*, 1985).

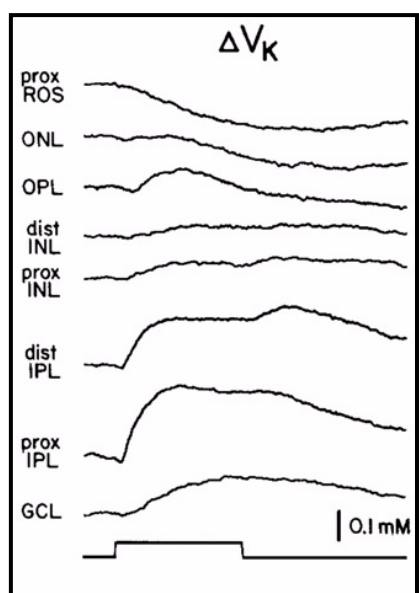
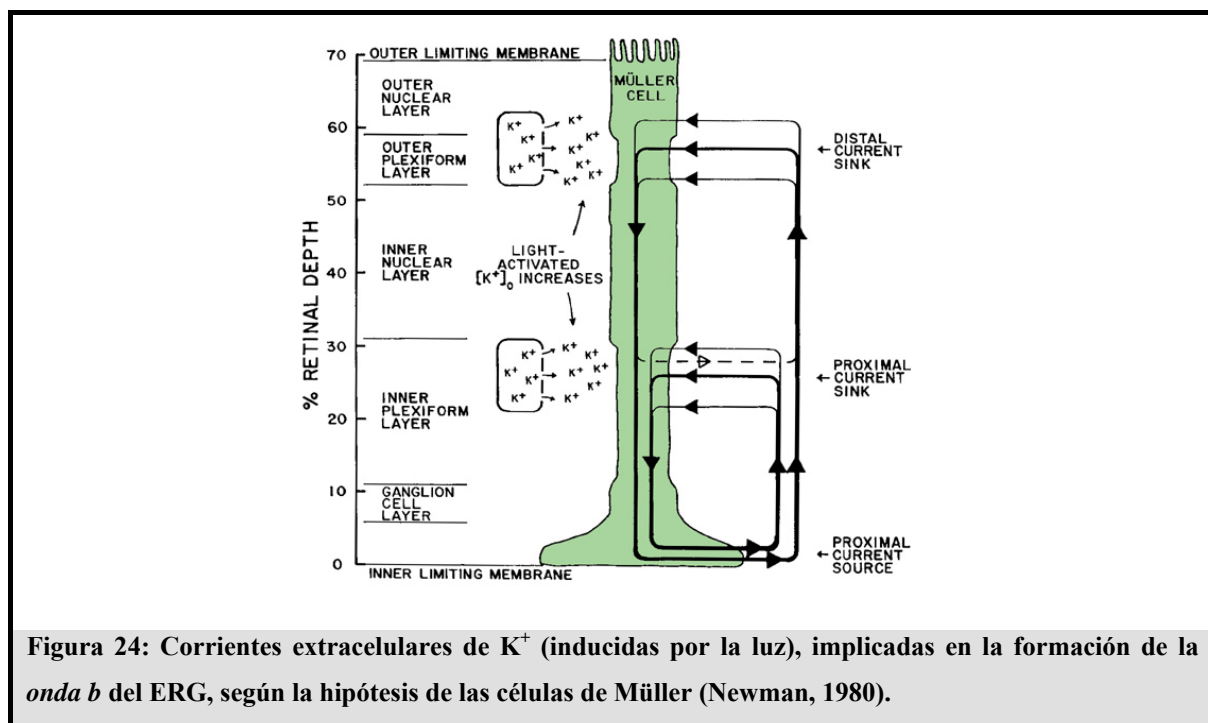


Figura 23: Cambios inducidos por la luz en la concentración extracelular de K^+ (ΔV_K), en las distintas capas de la retina (Karwoski *et al.*, 1985).

Por otra parte, se asume que este incremento del K^+ extracelular en la capa plexiforme externa tiene su origen en las células bipolares ON que se despolarizan con la luz (Dick *et al.*, 1985). En la capa plexiforme interna, el incremento de K^+ inducido por la luz resulta de la actividad de las células amacrinas y ganglionares (Karwoski *et al.*, 1985; Dick *et al.*, 1985). Los cambios en la

concentración de K^+ alteran el potencial de membrana de las células de Müller generando corrientes eléctricas en esas dos zonas (plexiforme interna y externa) que se escapan a través de sus terminaciones distales y proximales (**figura 24**) (Kline *et al.*, 1978; Newman, 1980).



El uso de agonistas y antagonistas específicos de los receptores de glutamato confirman el origen de la onda b. Al exponer la retina de los vertebrados al APB, un agonista de los receptores de glutamato, se elimina la onda b (Bush y Sieving, 1994, 1996; Sieving *et al.*, 1994; Kondo y Sieving, 2001; Ueno *et al.*, 2004). Debido a que estos receptores de glutamato sensibles al APB solo se encuentran en las células bipolares ON (Slaughter y Miller, 1981), se puede afirmar que dichas células participan en generar la onda b (Stockton y Slaughter, 1989; Gurevich y Slaughter, 1993). En otros estudios se consiguió aumentar la amplitud de la onda b utilizando otros agonistas, ya que estos anulan fuentes de corrientes que se oponen a la formación de la onda b, se trata de experimentos realizados con DNQX (Robson y Frishman, 1996) y con PDA (Sieving *et al.*, 1994; Bush y Sieving, 1996; Kondo y Sieving, 2001; Ueno *et al.*, 2004), ambos bloquean las células bipolares OFF (Slaughter y Miller, 1983a).

Sieving *et al.*, plantean que en la formación de la onda b del ERG fotópico del hombre y del mono, participan principalmente las células bipolares ON, mientras que las bipolares OFF y las horizontales se oponen (Sieving *et al.*, 1991). Esta teoría del “tira y afloja” (“push-pull”) entre las vías ON y OFF es la más aceptada actualmente (Sieving *et al.*, 1994).

Estudios más recientes basados en experimentos con fármacos y con microelectrodos apuntan directamente a las células bipolares ON como el origen de la *onda b* sin participación de las células de Müller (Karwoski y Xu, 1999; Green y Kapousta-Bruneau, 1999). Bajo determinadas condiciones, inyecciones Ba^{2+} dentro del humor vítreo incluso provocan el aumento de la *onda b* (Lei y Perlmann, 1999). Los iones de Ba^{2+} bloquean casi por completo la permeabilidad al K^+ de las células de Müller (Newman, 1989), con lo que cabía esperar que se eliminase la *onda b* de acuerdo con la hipótesis de las células de Müller, pero no fue el caso (Lei y Perlmann, 1999). Este hecho contradice la hipótesis de las células de Müller (Miller y Dowling, 1970; Miller, 1973; Karwoski y Proenza, 1977; Kline *et al.*, 1978; Newman, 1980) y apoya la hipótesis de las células bipolares ON (Stockton y Slaughter, 1989; Sieving *et al.*, 1991, 1994; Gurevich y Slaughter, 1993; Karwoski y Xu, 1999; Green y Kapousta-Bruneau, 1999; Friedburg *et al.*, 2004).

Los últimos estudios realizados en este campo indican que células de la retina de tercer orden (amacrinas y ganglionares) están también implicadas en la formación de la *onda b*, en su cinética y en su amplitud en el conejo (Dong y Hare, 2000). No ocurre lo mismo en el mono y en el hombre según Ueno *et al.*, ya que tras aplicar TTX y NMDA (que bloquean la mayoría o toda la actividad eléctrica de las células de tercer orden) obtuvieron ERGs con *ondas a* y *b* similares a los del grupo control (ojos sin medicar) (**figura 25**) (Ueno *et al.*, 2004).

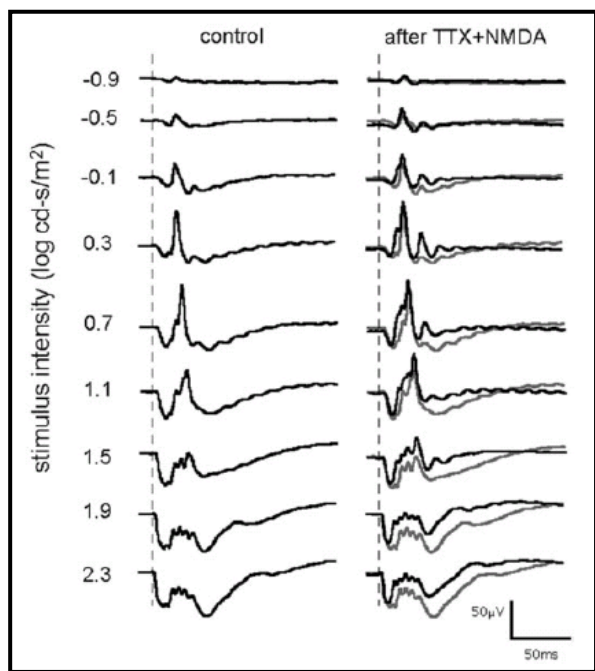


Figura 25: ERGs obtenidos en condiciones normales (columna de la izquierda), y tras aplicar TTX y NMDA (columna de la derecha). La combinación de TTX y NMDA no modifica apenas la morfología de las *ondas a* y *b*, e incrementa ligeramente la amplitud de la *onda i* (Ueno *et al.*, 2004).

En resumen, la *onda b* es una onda positiva cuyo origen es post-receptoral, que sigue la cinética de la despolarización de las células de Müller (Miller y Dowling, 1970; Miller, 1973; Karwoski y Proenza 1977; Kline *et al.*, 1978; Newman, 1980) y/o de las células bipolares ON (Stockton y Slaughter, 1989; Sieving *et al.*, 1991, 1994; Gurevich y Slaughter, 1993; Karwoski y Xu, 1999;

Green y Kapousta-Bruneau, 1999; Friedburg *et al.*, 2004) con implicación de células de tercer orden (ganglionares y amacrinas) en algunas especies (Dong y Hare, 2000). Al igual que ocurría con la *onda a*, tras una adaptación a la oscuridad larga y con unas condiciones de estimulación que activen tanto los conos como los bastones, es posible apreciar como la *onda b* se descompone en una *onda b1* más precoz y en una *onda b2*, bajo la dependencia respectivamente del sistema de los conos y del de los bastones (Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

2.2.1.4.- COMPONENTES MENORES DEL ERG:

Además de las tres ondas mayores (a, b y c) en el ERG se pueden identificar otros componentes bajo determinadas condiciones de registro. Algunos de estos componentes sirven para su uso en clínica humana o veterinaria y otros sirven principalmente para fines experimentales (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004; Rosolen *et al.*, 2005d).

2.2.1.4.1.- POTENCIALES OSCILATORIOS (OPs):

Cuando se usa un estímulo brillante de tipo flash para obtener ERGs tanto en humanos como en animales, se pueden observar unas pequeñas ondas oscilantes en la rama ascendente y también en la descendente de la *onda b*. Son ondas mucho más rápidas que las *ondas a* y *b*. Se aíslan fácilmente del ERG utilizando un filtro de banda pasante (por ejemplo de 100-300 Hz) que elimine las lentas y amplias *ondas a* y *b* (**figura 26**) (Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004; Rosolen *et al.*, 2005d). Los OPs no tienen todos el mismo origen (Peachey *et al.*, 1991). En una primera aproximación se aprecian 5 ondas, las ondas OP1 y OP2 estarían bajo la dependencia del sistema de los conos y las OP4 y OP5 del de los bastones (Lazard *et al.*, 2000). Por otra parte los OPs 2 y 3 estarían relacionados con las respuestas ON y el OP4 con las respuestas OFF (Kojima y Zrenner, 1978; Rufiange *et al.*, 2005).

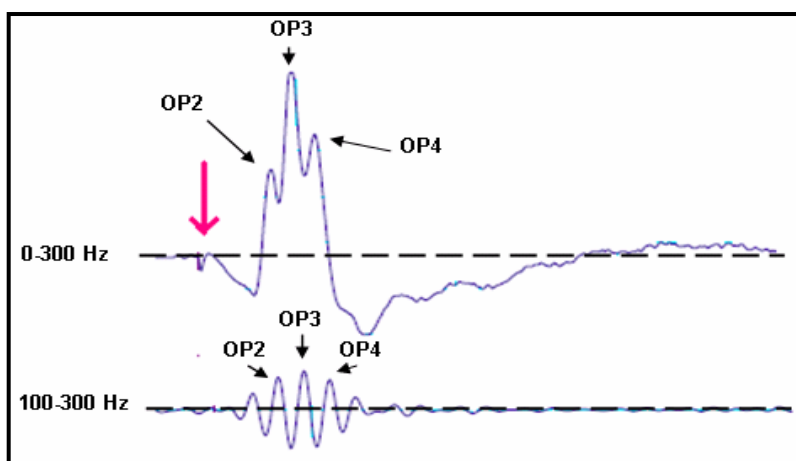


Figura 26: OPs mayores (2,3 y 4) en la rama ascendente y descendente de la *onda b* (trazado superior) y aislados por filtrado numérico (100-300 Hz) de la curva original (trazado inferior).

Registros con microelectrodos revelaron que los OPs alcanzan su máxima amplitud cuando aquellos se colocan en la retina interna. Se piensa que proceden de la capa plexiforme interna pero su origen celular exacto no se conoce (Brown y Wiesel, 1961a; 1961b; Brown, 1968). Estudios farmacológicos y con microelectrodos revelan que son el reflejo de corrientes extracelulares generadas por rutas de feed-back entre células amacrinas, ganglionares y bipolares (Wachtmeister, 1998). En el hombre y el mono tras aplicar TTX y NMDA en el vítreo se aprecia una leve reducción de los OPs lo cual confirma cierta contribución de células de tercer orden (Ueno *et al.*, 2004). La Chapelle relaciona la pérdida de 2 OPs en el hombre con lesión en el nervio óptico y/o en las células ganglionares (La Chapelle, 1990). En el perro no parecen guardar tanta relación con células de tercer orden (Yanase y Ogawa, 1996). Según varios autores los OPs están íntimamente ligados a la *onda b*, con lo que cambios en su amplitud afectarán proporcionalmente a la amplitud de la suma de OPs (Rousseau y La Chapelle, 2000).

Los OPs son muy sensibles a isquemias retinales, por lo tanto situaciones en las que las *ondas a* y *b* permanecen normales en forma y amplitud, los OPs pueden indicar alteraciones isquémicas en la retina interna como puede ocurrir en retinopatías diabéticas, para las cuales son buenos indicadores (Vadala *et al.*, 2002).

2.2.1.4.2.- ONDA d:

La *onda d* solo se puede ver cuando las fases ON y OFF del ERG están separadas en el tiempo utilizando estímulos de larga duración (más de 100 ms), si se usan estímulos más cortos se combina con la *onda b* (**figura 27**) (Bush y Sieving, 1996; Kondo y Sieving 2001; Ueno *et al.*, 2006).

Análisis de densidad y origen de corrientes muestran que se origina en las células bipolares OFF (Xu y Karwoski, 1995). Asimismo estudios farmacológicos en retinas de anfibios y de primates que utilizan bloqueantes específicos de células bipolares y receptores tipo AMPA/KA como el PDA o el DNQX demuestran que la *onda d* depende por completo de la transmisión sináptica de tipo AMPA/KA, la que existe entre los FR y las células bipolares OFF (Bush y Sieving, 1996; Kondo y Sieving, 2001). Según Ueno *et al.*, células de la retina de tercer orden también pueden participar en la formación de la *onda d* pero en muy pequeña medida, señalando que principalmente es la vía OFF la responsable y que la vía ON se opone (Ueno *et al.*, 2006).

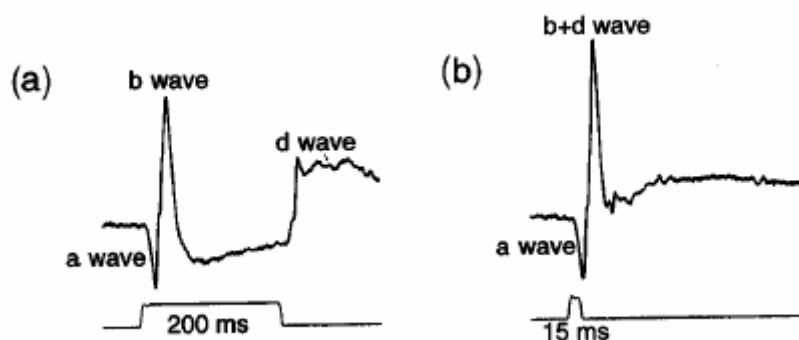
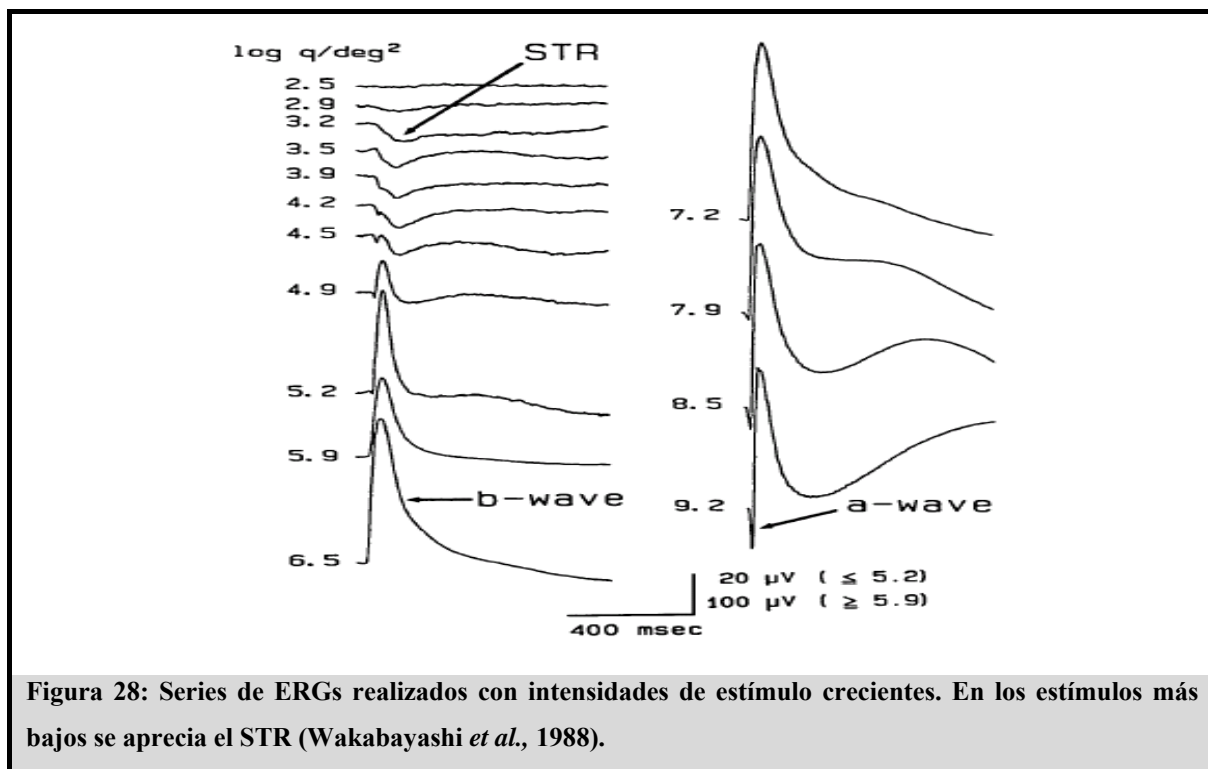


Figura 27: ERGs realizados con un estímulo largo (200 ms) en el que se aprecia la *onda d* (a), y con un estímulo corto (15 ms) en el que no se aprecia por que se combina con la *b* (b) (Bush y Sieving, 1996).

2.2.1.4.3.- RESPUESTA DE UMBRAL ESCOTÓPICO (STR):

Cuando se utiliza un estímulo muy bajo (más de 3 unidades logarítmicas de atenuación, cercano al umbral de sensibilidad de los bastones) en un ojo adaptado a la oscuridad se puede registrar una onda lenta y negativa; el STR (**figura 28**). Esta onda se ha visto entre otras especies en el gato, el mono (Wakabayashi *et al.*, 1988), el perro (Yanase *et al.*, 1996), el hombre (Sieving y Nino, 1988) y la rata (Saszik, 2002).

Varios estudios indican que el STR se origina debido a cambios inducidos por la luz en la concentración de K^+ extracelular en la retina proximal, originada en las células amacrinas (que afectan al potencial de membrana de las células de Müller) (Frishman y Steinberg, 1989). Los iones de Bario que bloquean la conductancia al K^+ de las células de Müller (Newman, 1989), eliminan el STR (Frishman y Steinberg, 1989). En otro estudio detallado con gatos y monos se observó que el STR era eliminado también tras la inyección intravítrea de ASP, mientras que la *onda a* se mantenía. Esto confirma el origen post-receptoral del STR (Wakabayashi *et al.*, 1988).



Actualmente se asume que el origen del STR es claramente distinto al de las ondas *a* y *b* y probablemente se encuentre en las células amacrinas y quizás también en las ganglionares (Fortune *et al.*, 2004), además de la participación de las células de Müller (Frishman y Steinberg, 1989).

Esta onda también fue descrita y estudiada en el perro, y se vio que al igual que en el hombre era una respuesta dependiente de los bastones. En el perro tiene gran amplitud, más de 50 µV (Yanase *et al.*, 1996), mientras que en el mono y en el hombre ronda los 20 µV (Sieving y Nino, 1988) y en el gato los 35 µV (Wakabayashi *et al.*, 1988). Para conseguir ver esta onda en el perro, es necesaria una total adaptación a la oscuridad (dos horas), la prueba debe realizarse en ambiente rigurosamente escotópico y con estímulos muy débiles (-4 o $-4,4 \log \text{cd.s/m}^2$). Tiene un tiempo de culminación de unos 80 milisegundos y su sensibilidad espectral es similar a la de los bastones; de 500 a 510 nm. En el perro el STR desaparece si el ambiente no es totalmente escotópico, en concreto con ambientes luminosos de $-3,5 \log \text{cd/m}^2$ o superiores. (Yanase *et al.*, 1996).

2.2.1.4.4.- ONDA *i*:

La onda *i* es un componente del ERG de reciente discusión en animales (Rosolen *et al.*, 2004b). Representa un pequeño componente positivo que en ocasiones sigue a la onda *b* del ERG obtenido en condiciones fotópicas (figura 29). Recientemente Rousseau *et al.*, mostraron evidencias experimentales que relacionan la onda *i* con el componente P_{50} del (PERG) (Rousseau *et al.*, 1996),

este último originado a nivel de las células ganglionares (Holder, 2001). Por otra parte se sabe que 2 OPs están específicamente abolidos en pacientes humanos que presentan atrofia de nervio óptico y/o células ganglionares (La Chapelle, 1990). Esos OPs aparecen normalmente a latencias similares a las que aparece la *onda i* sugiriendo que esa región temporal del ERG fotópico representa la actividad de células ganglionares o cercanas a estas (Rosolen *et al.*, 2004b). Por otra parte en un reciente estudio con cerdos miniatura se vio que la *onda i* era el único componente del ERG que desaparecía tras inducir glaucoma (Rosolen *et al.*, 2003) con la consiguiente lesión de células ganglionares (Fortune *et al.*, 2004).

Un reciente trabajo indica que tras inyección vítrea de TTX y NMDA en ojos de monos, la *onda i* no se elimina sino que incluso aumenta lo cual según los autores indicaría que células de tercer orden (amacrinas y/o ganglionares) no participan directamente en su formación (Ueno *et al.*, 2004). Por otra parte en el hombre se ha visto recientemente que se mantenía la *onda i* con patologías del nervio óptico y de las células ganglionares. Además se consiguió eliminar la *onda i* aplicando PDA (Rangaswamy *et al.*, 2004). Estos recientes estudios indican que las células ganglionares no participan directamente en la formación de la *onda i* y que las bipolares OFF y quizás las horizontales sí lo hacen, cuanto menos en el hombre y en el mono (Rangaswamy *et al.*, 2004; Ueno *et al.*, 2004).

La *onda i* es evidente en humanos, monos, conejos, cerdos, cochinito de indias, perros y gatos. Sin embargo en ratas y ratones destacan los OPs mientras que las *ondas a* e *i* son muy pequeñas o no aparecen (**figura 29**) (Rosolen *et al.*, 2004b).

La *onda i* aparece entorno a los 50 ms en la mayoría de las especies según Rosolen *et al.*, y entre los 35 y 50 ms según Gouras y Mackay (Gouras y Mackay, 1988; Rosolen *et al.*, 2004b). La incapacidad para registrar la *onda i* en ratas y ratones podría explicarse por la naturaleza fotópica de esta onda, en efecto, las ratas y ratones presentan un bajo porcentaje de conos. Por otra parte la gran amplitud de los OPs en la rama ascendente y también descendente de estas especies junto con el poco declive de la *onda b* podrían enmascarar la *onda i*. Próximos estudios en esta línea van encaminados a bien definir las condiciones de estimulación para obtener la *onda i*, de forma repetible, con una buena amplitud y bien separada de la *onda b*, incluso en ratas y ratones (Rosolen *et al.*, 2004b).

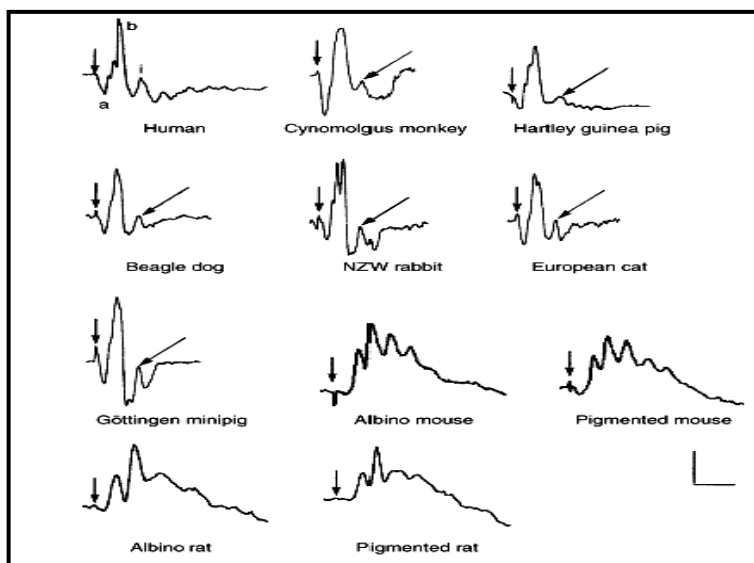


Figura 29: Onda i registrada en los ERGs de distintas especies. En la rata y en el ratón no se aprecia o es muy pequeña (Rosolen *et al.*, 2004b).

2.2.1.4.5.- RESPUESTA FOTÓPICA NEGATIVA (PhNR):

El origen de este potencial negativo ha sido recientemente atribuido a las células de la retina interna en la rata (Raz-Prag *et al.*, 2004), en el mono (Viswanathan *et al.*, 1999; Frishman *et al.*, 2002), en el hombre (Viswanathan *et al.*, 2001) y en el gato (Viswanathan y Frishman, 1997). En efecto, según estos y otros estudios realizados en pacientes con glaucoma adquirido o inducido, este potencial lento y negativo del ERG fotópico de pleno campo proviene de la retina interna y en particular de las células ganglionares. En estos experimentos se observó como esta respuesta disminuía o desaparecía en los ojos con glaucoma (**figura 30**) (Frishman *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 1999; 2001).

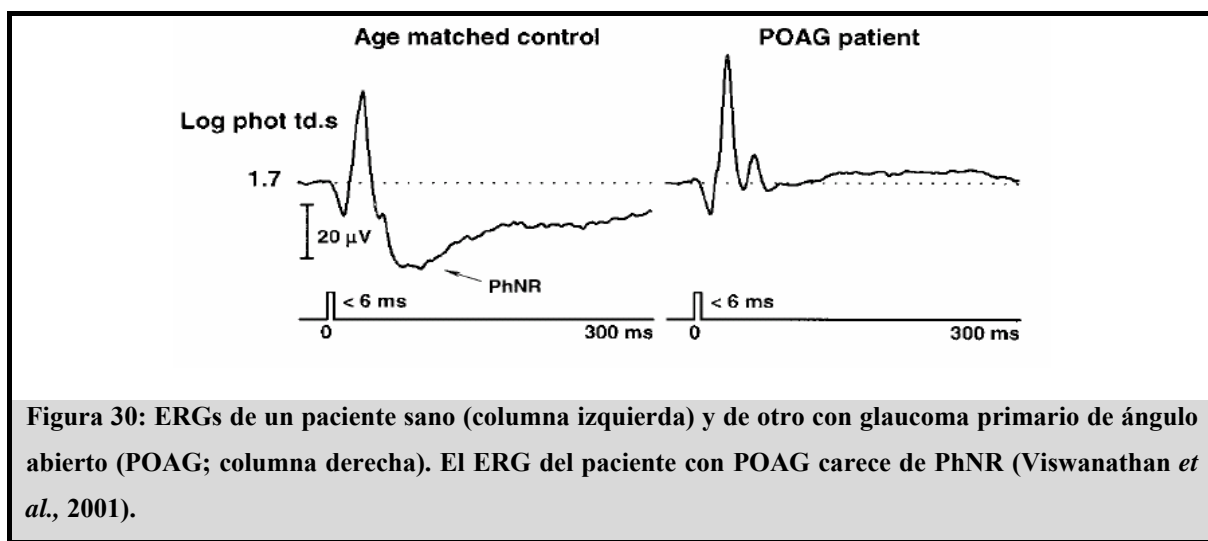


Figura 30: ERGs de un paciente sano (columna izquierda) y de otro con glaucoma primario de ángulo abierto (POAG; columna derecha). El ERG del paciente con POAG carece de PhNR (Viswanathan *et al.*, 2001).

Los ojos normales presentan una PhNR tras la *onda b* de entre 60 y 120 μV en el mono (Frishman *et al.*, 2002).

Resultados similares se han visto en monos tras inyectar TTX y NMDA (Ueno *et al.*, 2004) y en humanos con patologías del NO y de las células ganglionares (Rangaswamy *et al.*, 2004). La PhNR también es abolida por los iones de bario, que bloquean los canales de K^+ afectando a corrientes en la glía, lo que indica que este tipo de células (gliales) también están implicadas en su formación (Raz-Prag *et al.*, 2004).

El PERG es el método más utilizado para valorar la funcionalidad de las células ganglionares. La PhNR posee un tiempo de culminación muy similar a la onda negativa N_{95} del PERG que se sabe tiene su origen en las células ganglionares (Holder, 2001). Por todo esto se piensa que la PhNR, al igual que el PERG, puede ser útil para valorar la función de las células ganglionares, siendo aquella más fácil de registrar que el PERG (Viswanathan y Frishman, 1997; Viswanathan *et al.*, 1999, 2001; Frishman *et al.*, 2002; Raz-Prag *et al.*, 2004).

Recientemente Rosolen *et al.*, concluyen que una onda negativa posterior a la *onda b* similar a la PhNR guarda relación con el *tapetum lucidum* (TL), ya que refieren dos casos de perros desprovistos de TL con ERGs normales pero con ausencia de negatividad tras la *onda b* (Rosolen *et al.*, 2005a). Por otro lado en otro estudio de los mismos autores se comparan los ERGs de especies sin TL, el cerdo y el mono, con los de especies con TL, el perro y el gato, observando que las especies con TL no tienen o está muy disminuida la negatividad tras la *onda b*. Se cree que esta negatividad post *onda b* guarda relación con el TL y además es distinta de la PhNR anteriormente descrita ya que la primera se puede registrar también en condiciones escotópicas (Rosolen *et al.*, 2005b).

2.2.1.4.6.- POTENCIAL DE RECEPCIÓN PRECOZ (PRP):

Esta respuesta eléctrica es la primera de la retina tras una estimulación luminosa, aparece inmediatamente tras el estímulo y tiene un patrón bifásico. En el hombre termina dentro de los primeros 1.5 ms y a continuación viene la *onda a*. Registros intracelulares y con microelectrodos demuestran que el PRP se origina en los FR (Murakami y Pak, 1970). La amplitud del PRP depende directamente de la intensidad del estímulo y de la cantidad de pigmentos visuales en los segmentos externos de los FR. Se cree que el PRP refleja cambios en el dipolo, debidos a modificaciones en la conformación de los pigmentos visuales cuando absorben fotones (Murakami y Pak, 1970). En humana se hacen registros de manera ocasional para estimar la cantidad de rodopsina en pacientes con retinosis pigmentaria, una enfermedad de los FR (Benítez del Castillo *et al.*, 2002). Su empleo en clínica no se ha generalizado entre otras cosas porque requiere estimulaciones luminosas muy breves (0,8 ms) y muy intensas lo cual suele ser molesto para

pacientes despiertos. La morfología del PRP muestra dos ondas, la primera R1 positiva es breve y sin latencia medible. La otra R2, negativa, más lenta y amplia, se considera que es preludio de la onda a del ERG (figura 31) (Walther y Hellner, 1986).

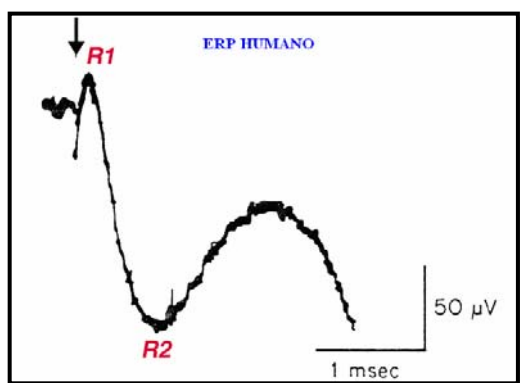


Figura 31: ERP humano con una onda positiva (R1) y otra más lenta y negativa (R2) (Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

2.2.1.4.- PRUEBAS ESPECIALES Y MODALIDADES DEL ERG:

El sistema visual de los vertebrados se puede separar en dos subsistemas, el de los conos (visión diurna) y el de los bastones (visión nocturna). Ambos sistemas operan de manera independiente con muy pocas interacciones entre ellos. Así el sistema más sensible frente a determinadas situaciones es el que determina la visión (Kolb, 2003). En algunas especies el sistema de los bastones es el que domina (ratas) y en otras es el de los conos (algunos reptiles) el que lo hace. No obstante en la mayoría de las especies, incluidas la humana y la canina, se encuentran ambos sistemas bien desarrollados, son retinas duales (Samuelson, 1999).

En electrofisiología existe la ventaja de poder modular las condiciones de estimulación para separar la actividad de conos y bastones. Esto es de suma importancia ya que ante determinadas patologías se verá más afectado el sistema de los conos que el de los bastones o vice-versa (Narfström y Ekesten, 1999). Así utilizando iluminaciones ambientales de cierta intensidad, se saturan los bastones obteniendo respuestas dependientes únicamente del sistema de los conos como describiremos a continuación en el caso del “photopic hill” o del ERG flicker (Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004). De otra manera, y sabiendo que los bastones no son capaces de responder a frecuencias de estimulación superiores a 20 Hz, podemos aislar la respuesta dependiente de conos aplicando frecuencias de estímulo cercanas a 30 Hz, como en el caso del flicker de altas frecuencias descrito más adelante (Dodt, 1951; Benítez del Castillo, 1999).

El ERG fotópico (sistema de los conos) se caracteriza por su rápida cinética y su pequeña amplitud mientras que el ERG escotópico (sistema de los bastones) tiene propiedades temporales más lentas pero una considerable mayor amplitud. Si lo que queremos es poner en evidencia ambos sistemas debemos operar con ambientes luminosos que no saturan a los bastones y con frecuencias de

estímulos a los que puedan responder los bastones (menos de 20 Hz) pero con suficiente intensidad para que los conos respondan; de esa manera se obtiene una respuesta global de la retina (Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

2.2.1.4.1.- ERG FOTÓPICO:

2.2.1.4.1.1.- ERG flicker, definición y origen:

Cuando se utilizan frecuencias de estimulación bajas (menos de 4 Hz) se obtienen respuestas llamadas transitorias. Al aplicar estímulos de más de 4 Hz se obtienen respuestas entretenidas. Tales frecuencias se utilizan para realizar el ERG flicker (30 Hz). Estas frecuencias de estimulación elevadas permiten seleccionar de manera preferente circuitos de conducción M (magnocelulares), ya que solo estas pueden gestionar esas altas frecuencias temporales y conducir el influjo de la mayoría de los conos (Lazard *et al.*, 2000).

Hasta 20 Hz tanto los bastones como los conos son capaces de responder pero más allá solo responden los conos. Esta peculiaridad la aprovechan los electrofisiólogos para aislar la respuesta de los conos de la de los bastones, cuando realiza el flicker de 30 Hz (Dodt, 1951). Si seguimos subiendo la frecuencia temporal del estímulo la amplitud de las respuestas disminuye ya que las vías visuales no son capaces de codificar frecuencias tan altas, de manera que en el perro, entorno a los 70 Hz, encontramos la frecuencia de fusión del ERG (Miller y Murphy, 1995). La búsqueda paso a paso de la frecuencia de fusión del ERG variando la frecuencia y la luminancia del estímulo, permite establecer una curva característica de la respuesta de los conos y de la de los bastones, que varía según la especie, la edad y las distintas patologías oculares (Gum *et al.*, 1984; Lazard *et al.*, 2000).

Durante años, merced a trabajos de varios investigadores, se atribuyó el origen del flicker a potenciales originados en los FR. En efecto, Baron *et al.*, vieron que el bloqueo de la conducción postsináptica a los FR con ASP no afectaba al flicker registrado a nivel de la fovea del mono. Concluyeron que el componente principal del flicker lo aportaban los FR (Baron *et al.*, 1979a; 1979b). Otros investigadores tomaron registros intracelulares de las células de Müller, llegando a la conclusión y acorde a las investigaciones de Baron *et al.*, que los potenciales del ERG derivados de las mismas respondían de manera pobre a estímulos de tipo flicker (Miller y Dowling, 1970). Por otro lado, estudios en ratas demuestran que el componente PIII lento, atribuido a las células de Müller (Karwoski y Proenza, 1977) no puede seguir frecuencias de flicker por encima de 3 Hz (Ernst y Arden, 1972). Estos y otros autores opinan en base a sus investigaciones que el flicker tiene su origen en los FR, y en particular en los conos con estímulos superiores a los 25 Hz (Baron *et al.*, 1979a; 1979b; Abraham *et al.*, 1985).

En ninguno de estos trabajos se realizaron registros corneales de contraste es decir los registros fueron únicamente locales, intrarretinales. En un posterior estudio, Donovan y Baron compararon los resultados obtenidos a nivel corneal y a nivel intrarretinal llegando a la conclusión de que para flicker de entre 4 y 8 Hz, el ERG corneal y el intrarretinal se originan al mismo nivel, es decir en los conos (Donovan y Baron, 1982).

No obstante hay evidencias de que los conos no son la única fuente del flicker ERG. Rosolen *et al.*, realizaron ERGs (ERG 1,3 Hz, 30,3 Hz y ERG tras adaptación a la oscuridad) a varias especies animales entre ellas el mono, la rata albina y la pigmentada, el perro y el gato. Los ratios ERG fotópico (conos)/ERG escotópico (bastones) fueron bastante acordes con los ratios anatómicos conos/bastones. Sin embargo, el ratio 1,3/30,3 Hz parecía no seguir ninguna lógica, no siendo capaces de proporcionar una explicación de que es lo que realmente se valora con el flicker de alta frecuencia (Rosolen *et al.*, 2004a). Por otro lado existen varios trabajos que relacionan el aminoácido glicina con ceguera temporal. En estos artículos describen casos de pérdida de visión tras recibir una irrigación con un suero rico en glicina durante una cirugía de próstata. Creel *et al.*, lograron mediante inyección intravítrea de glicina hacer desaparecer del ERG la *onda b* y los OPs mientras que se mantenía la *onda a*, y por otro lado se atenuaba también el flicker de 30 Hz (**figura 32**). Esto ocurre según los autores debido a que la glicina bloquea la conducción a nivel de las células amacrinas (Creel *et al.*, 1987).

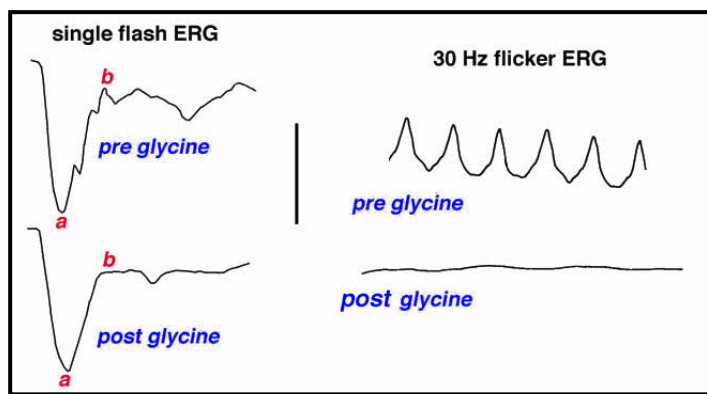


Figura 32: ERGs obtenidos antes y después de aplicar glicina en el vítreo (Creel *et al.*, 1987).

En 1996 se publica un trabajo hecho con monos en el que se aísla la actividad de los FR utilizando ASP por un lado y una combinación APB y PDA por el otro. Este estudio concluye que para el flicker fotópico rápido (30 Hz o más) las respuestas derivan en menor medida de los FR (conos) y en mayor grado de células de segundo orden (retina proximal) posteriores a los mismos. Además añade que el flicker rápido (30 Hz o más) registrado a nivel corneal, es generado por las mismas células que forman (directa o indirectamente) la *onda b* y la *d* del ERG flash (Bush y Sieving, 1996).

Otro estudio más reciente realizado también en monos, que también utiliza APB y PDA saca conclusiones similares y además, mediante un complicado análisis vectorial de las respuestas, añade que a frecuencias inferiores a 24 Hz la contribución de los conos al flicker es mayor que la de los componentes postsinápticos ocurriendo lo contrario a frecuencias de estimulación de más de 24 Hz (**figura 33**).

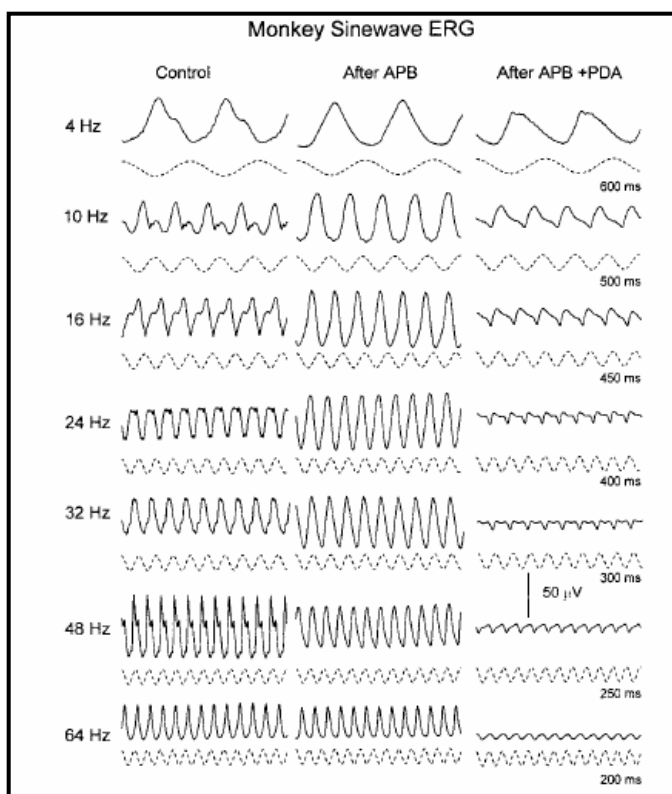


Figura 33: ERG Flicker del mono realizado a distintas frecuencias de estimulación (4-64 Hz), antes (columna de la izquierda) y después de aplicar APB (columna del medio), o la mezcla de APB y PDA (columna de la derecha) (Kondo y Sieving, 2001).

En efecto, a partir de 4 Hz y hasta 10 Hz la contribución de los conos es mayoritaria y después va disminuyendo aportando la mitad o menos de las respuestas a 16 Hz para finalmente ser minoritaria (menos del 20 %) a partir de 24 Hz. De su complicado análisis vectorial podemos resumir que los componentes ON y OFF tienen un desfase que varía de 160 a 230 ° en función de la frecuencia del flicker. Así, debido a ese desfase, los componentes ON y OFF interfieren entre sí dando como resultado un componente más pequeño que cada uno de ellos por separado. Este hecho se hace más patente a 10 Hz, en donde el desfase entre los componentes ON y OFF es de unos 180° (están opuestos), y aunque por separado los componentes sean más grandes que el de los FR, se anulan parcialmente (no se anulan del todo ya que a esa frecuencia el componente OFF es ligeramente mayor al ON) entre sí dejando una respuesta global más pequeña que en 4 Hz. Finalmente a 32 Hz el desfase ON-OFF ronda los 230° y además el componente de los FR es muy pequeño dando como resultado un flicker dominado por la actividad post-sináptica ON-OFF (**figura 34**) (Kondo y Sieving, 2001).

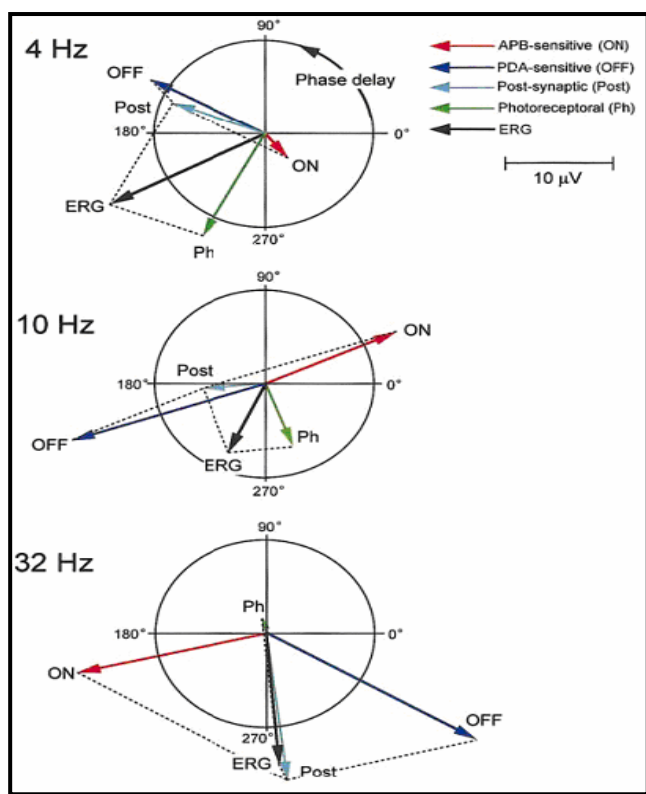
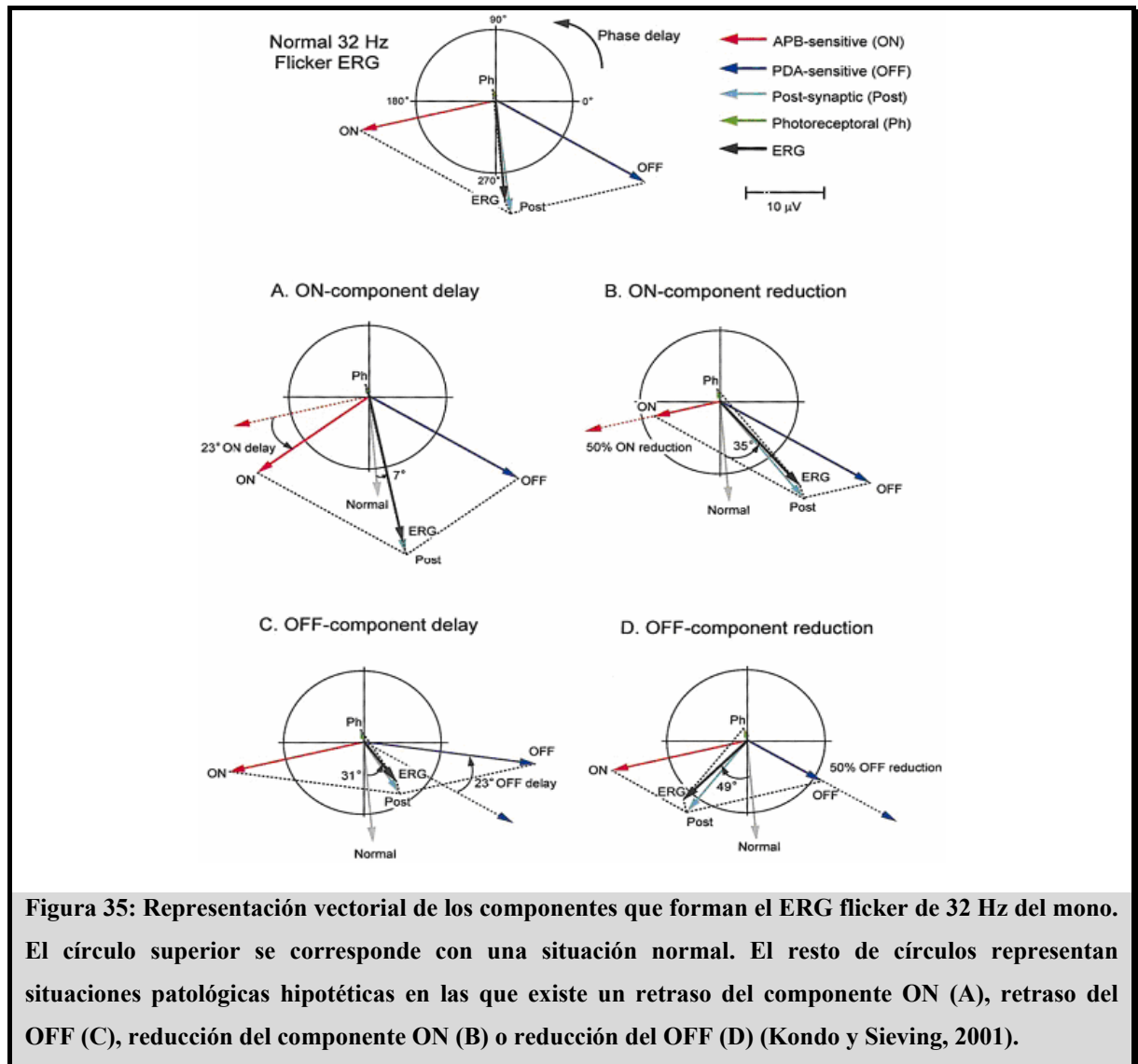


Figura 34: Representación vectorial de los distintos componentes del ERG flicker de 4, 10 y 32 Hz: ON, OFF (vías post-sinápticas; post) y FR (ph). (Kondo y Sieving, 2001).

Estos resultados sugieren que es importante tener en cuenta la amplitud pero también la fase de los tres principales ingredientes del flicker ERG (vías ON, OFF y FR). En efecto, la amplitud absoluta de los vectores por separado no es suficiente para describir los resultados, como ocurre a 10 Hz en donde los componentes ON y OFF son grandes pero desfasados diametralmente, con lo que se cancelan en gran parte dando como resultado una considerable contribución del vector de los FR mucho más pequeño (Kondo y Sieving, 2001).

Estos mismos autores realizan un muy interesante modelo de vectores para ayudar a comprender como disfunciones en células post-receptorales (ON y OFF) que alteren la amplitud o la fase de las respuestas ON y OFF repercuten en el ERG flicker de 32 Hz. Un retraso en el componente ON de 23 ° provoca un aumento cercano al 48 % del ERG flicker con solo 7° de variación en el ERG resultante. Si ese mismo retraso es en el componente OFF, el ERG disminuye un 50% con respecto al control y se retrasa 31°. Es interesante ver como reducciones de hasta el 50 % en el componente ON no provocan apenas cambios en el ERG con respecto al control, pero si que lo retrasan 35° (unos 3 ms). Por último una reducción del componente OFF del 50 %, disminuye el ERG un 17% y lo adelanta 49° (unos 4 ms) (**figura 35**) (Kondo y Sieving, 2001).



Estos resultados indican que disfunciones en los componentes post-sinápticos, que afecten diferencialmente a las vías ON u OFF (Sieving, 1993), como ocurre en ciertas formas de ceguera nocturna (Barnes *et al.*, 2002) o en la retinitis pigmentaria pueden cambiar sustancialmente el flicker ERG tanto en fase como en amplitud (Alexander *et al.*, 2003).

Lo anteriormente descrito se refiere al flicker obtenido en respuesta a estímulos sinusoidales y al análisis del componente fundamental del mismo (Kondo y Sieving, 2001). En efecto, el flicker es una respuesta en forma de onda con aspecto más o menos sinusoidal (según el tipo de estímulo utilizado). Mediante un análisis armónico es posible descomponer la respuesta en un componente fundamental (que se corresponde con la frecuencia del estímulo), y otros sucesivos componentes armónicos. Esto se realiza con el análisis de Fourier (**figura 36**) (Bach y Meigen, 1999).

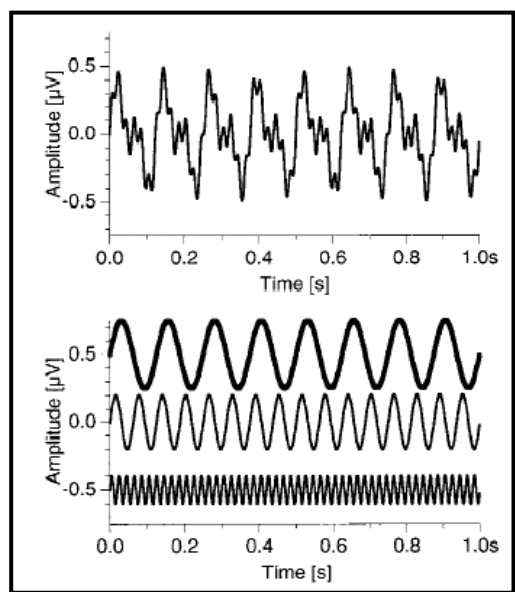


Figura 36: Descomposición de una onda sinusoidal compleja (gráfico superior) en su componente fundamental y sucesivos armónicos (gráfico inferior), mediante el análisis de Fourier (Bach y Meigen, 1999).

La descomposición en componentes fundamental y sucesivos puede ser útil, ya que según algunos autores pueden tener orígenes distintos en la retina, y en ciertas patologías se afectan más unos u otros componentes con estímulos sinusoidales (Falsini *et al.*, 1999).

El ERG flicker se puede obtener mediante varios tipos de estímulos: sinusoidales, de ondas cuadradas, pulsos o flash estroboscópicos blancos (Kondo y Sieving, 2002). Estos últimos son los más utilizados en la clínica habitual (Marmor *et al.*, 2004).

Kondo y Sieving realizaron registros de flicker con cada uno de estos tipos de estímulos para completar su anterior estudio que solo usaba estímulos sinusoidales. Concluyeron que las frecuencias de flicker cercanas a 30 Hz tienen el mismo origen independientemente del tipo de estímulo (células post-receptorales ON y OFF). Las diferencias encontradas entre estímulos sinusoidales y estroboscópicos blancos son dos fundamentalmente:

1. Los componentes ON y OFF están unos 20° más desfasados con estímulos sinusoidales. Esto hace que su comportamiento ante variaciones de los componentes ON y OFF sea ligeramente diferente (**figura 37**). Aunque considerables cambios en la amplitud de vías ON u OFF siguen sin alterar mucho la amplitud global del flicker en cualquiera de los 4 tipos de estímulos. El motivo de esta diferencia, según los autores, no está muy claro pero podría deberse a que con los flashes estroboscópicos los eventos ON y OFF se evocan casi a la vez, mientras que en los estímulos sinusoidales están más separados (Kondo y Sieving, 2002).

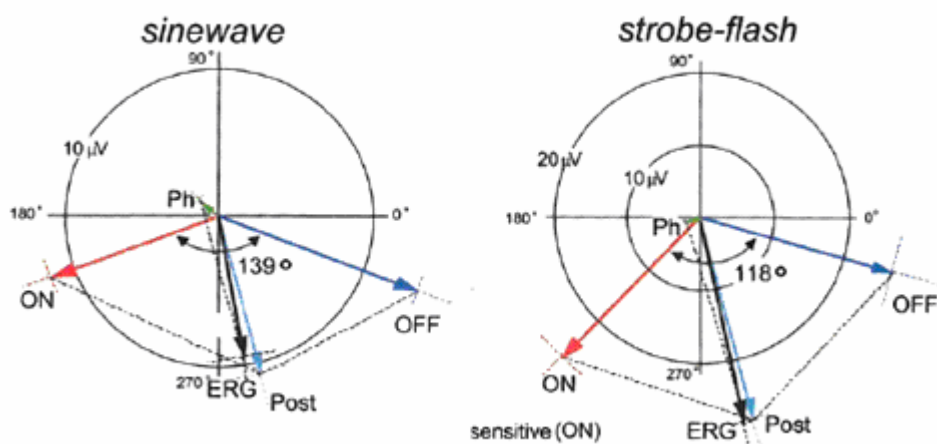


Figura 37: Representación vectorial de los distintos componentes que forman el ERG flicker de 32 Hz, en respuesta a estímulos sinusoidales (círculo de la izquierda) o a estímulos con flash estroboscópico (Kondo y Sieving, 2002).

2. Con estímulos sinusoidales la mayoría de la respuesta está contenida en el componente fundamental, mientras que el segundo componente armónico aporta bastante a la respuesta en el caso del flash estroboscópico (**figura 38**) (Kondo y Sieving, 2002).

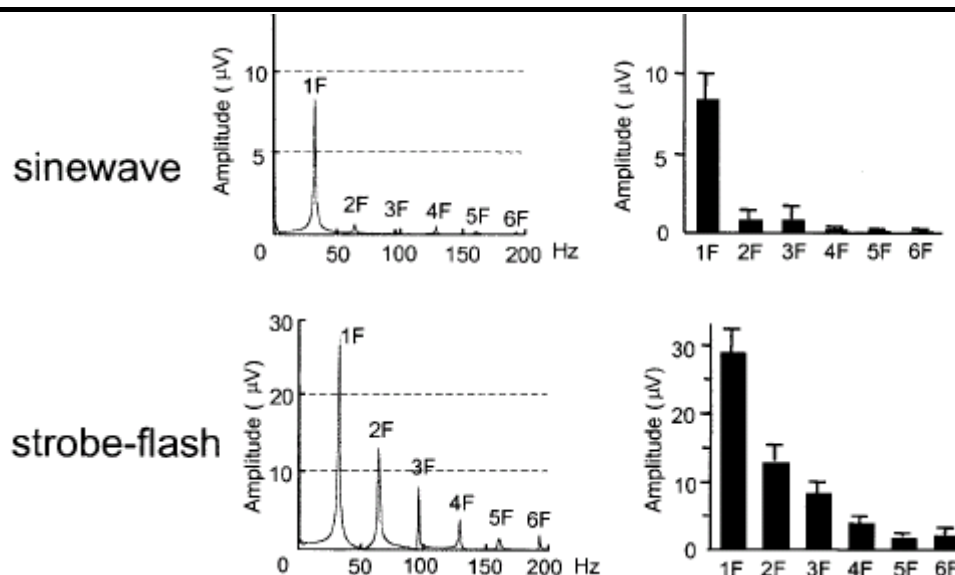


Figura 38: Amplitud del componente fundamental y sucesivos armónicos en el flicker de 32 Hz evocado por estímulos sinusoidales (arriba) o por flashes estroboscópicos (abajo) (Kondo y Sieving, 2002).

Los segundos y sucesivos componentes armónicos con estímulos estroboscópicos requieren participación de las rutas ON y OFF, ya que responden de manera similar a como lo hace el componente fundamental al bloqueo de las rutas ON y OFF mediante APB y PDA. En efecto, con estímulos sinusoidales el segundo componente no se ve afectado por la supresión mediante APB y PDA de las vías ON y OFF, lo que indicaría que tiene un origen distinto al componente fundamental, que según algunos autores puede hallarse en la retina interna (células de tercer orden) (**figura 39**) (Falsini *et al.*, 1999; Kondo y Sieving, 2002).

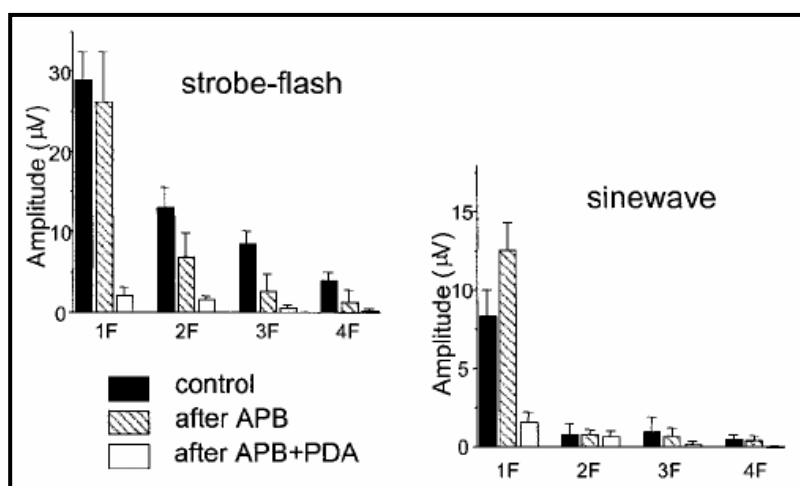


Figura 39: Componentes fundamental y sucesivos armónicos del ERG flicker de 32 Hz evocado con estímulos sinusoidales (izquierda) o con flashes estroboscópicos (izquierda), antes (control) y después de aplicar APB, o la mezcla de APB y PDA (Kondo y Sieving, 2002).

En un trabajo reciente realizado en monos, se vio que la hiperglucemia transitoria obtenida tras inyectar glucosa por vía endovenosa no influenciaba al ERG fotópico de pleno campo, pero sí el flicker a frecuencias por encima de 12 Hz en donde bajaba la amplitud significativamente. Estudios previos sugieren que la hiperglucemia puede reducir la vasodilatación retiniana inducida por el propio flicker, inhibiendo la vasodilatación endotelio-dependiente en pacientes no diabéticos humanos (Rosolen *et al.*, 2005c). Una actividad nerviosa considerable en la retina, en este caso estímulos flicker de 15 Hz o más, durante 20 segundos o más, provocan una importante vasodilatación a nivel del nervio óptico en el humano, de manera similar a la vasodilatación que aparece en otras zonas del sistema nervioso tras gran actividad nerviosa. Además esa vasodilatación parece estar correlacionada con la amplitud del flicker tanto del componente fundamental como del segundo armónico (Falsini *et al.*, 2002).

Este fenómeno corresponde a un acoplamiento neuro-vascular que todavía no ha sido definido con detalle. Hay evidencias de que en el gato y en el hombre podría deberse a ciertas sustancias, principalmente el óxido nítrico, al cual son reactivas ciertas células como los pericitos que rodean los capilares del NO (Kondo *et al.*, 1997; Falsini *et al.*, 2002).

Quizás por lo anterior, el flicker de 30 Hz ha demostrado ser útil en la detección y monitorización temprana de la obstrucción de la vena central de la retina en humanos (Larsson *et al.*, 2000), resultando ser una prueba todavía más fiable que la angiografía fluoresceínica (Larsson *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que la neurorretina recibe sangre de los vasos retinianos y los FR fundamentalmente de la coroides (Samuelson, 1999; Delaey y Van de Voorde, 2000), parece claro de nuevo que el flicker de 30 Hz no depende únicamente de los FR sino sobre todo de células de la neurorretina distales a los mismos (bipolares ON, OFF y horizontales) (Bush y Sieving, 1996; Kondo y Sieving, 2001; 2002).

2.2.1.4.1.2.- Curvas de luminancia-respuesta, definición y origen:

La amplitud de la *onda b* en ambiente fotópico de la curva luminancia-respuesta no es una función simple. En efecto, a bajas e intermedias intensidades la amplitud de la *onda b* del ERG fotópico aumenta cuando aumenta la intensidad del estímulo, sin embargo curiosamente con estímulos cada vez más intensos la *onda b* primero disminuye y luego se mantiene hasta igualarse con la *onda a*. Este peculiar comportamiento ha sido descrito por primera vez en el hombre por Wali y Leguire (Wali y Leguire, 1992). Los anglosajones llaman a este fenómeno “**photopic hill**”, debido a la forma de U invertida que toma la gráfica cuando se representa la amplitud de la *onda b* en función de la intensidad del estímulo (**figura 40**). El “photopic hill” también se ha registrado en otras especies como en roedores (siendo menos prominente que en primates) o en perros (Rosolen *et al.*, 2005d).

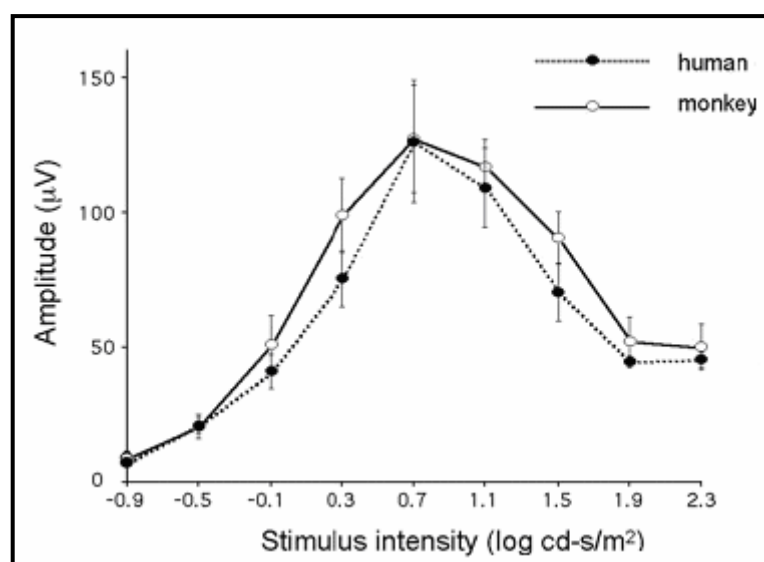


Figura 40: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas (“photopic hill”) del hombre (línea punteada) y del mono (línea continua). El eje de abscisas representa la amplitud de la *onda b* y el de coordenadas la intensidad del estímulo (Ueno *et al.*, 2004).

Rufiange *et al.*, sugirieron un método de análisis de esta peculiar función electrorretinográfica basada en siete descriptores fácilmente identificables (**figura 41**) (Rufiange *et al.*, 2003):

1. Pico de b o V_{\max} .
2. Amplitud de la *onda a* en la intensidad luminosa necesaria para alcanzar el V_{\max} es decir a_{\max} .
3. Intensidad luminosa del flash necesaria para alcanzar el V_{\max} , es decir I_{\max} .
4. Relación entre la amplitud de b y de a medida en V_{\max} (b/a).
5. K_a que representa la intensidad de estimulación necesaria para producir una *onda b* cuya amplitud sea la mitad de la amplitud en V_{\max} en la parte ascendente del “photopic hill”.
6. K_d que representa la intensidad de estimulación necesaria para producir una *onda b* cuya amplitud sea la mitad de la amplitud en V_{\max} en la parte descendente del “photopic hill”.
7. $K_{a=b}$, que representa la intensidad de estimulación necesaria para generar un ERG en donde la amplitud de la *onda a* sea igual a la de la *onda b*.

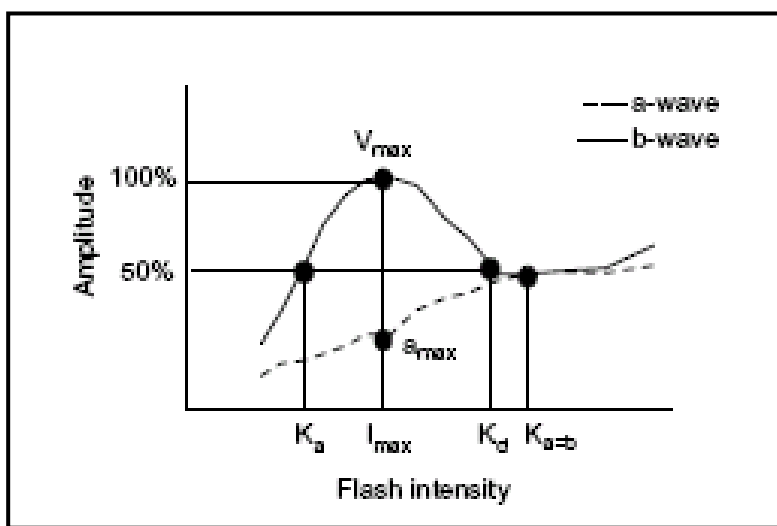


Figura 41: Descriptores para analizar el “photopic hill” (Rufiange *et al.*, 2005).

Estos mismos autores además compararon el photopic hill de varios pacientes humanos en dos ambientes luminosos diferentes: 17 cd/m^2 y 30 cd/m^2 obteniendo resultados similares (**figura 42**) (Rufiange *et al.*, 2003). Ambas luminosidades de ambiente están dentro de los rangos recomendados por la *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV) para desensibilizar/saturar los bastones (Marmor *et al.*, 2004).

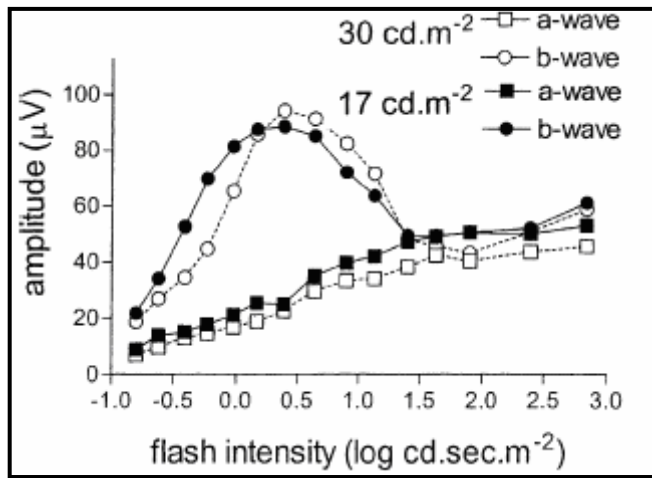


Figura 42: "Photopic hill" del hombre en dos ambientes luminosos diferentes: $30 \text{ cd} \cdot \text{m}^{-2}$ (trazado punteado) y $17 \text{ cd} \cdot \text{m}^{-2}$ (trazado continuo) (Rufiange *et al.*, 2003).

En el perro, el "photopic hill" tiene un aspecto muy parecido al del mono y al del hombre, con la diferencia de que el V_{\max} se encuentra con estímulos más débiles y de que las ondas *a* y *b* permanecen hasta intensidades luminosas más bajas (figura 43) (Rosolen *et al.*, 2005d).

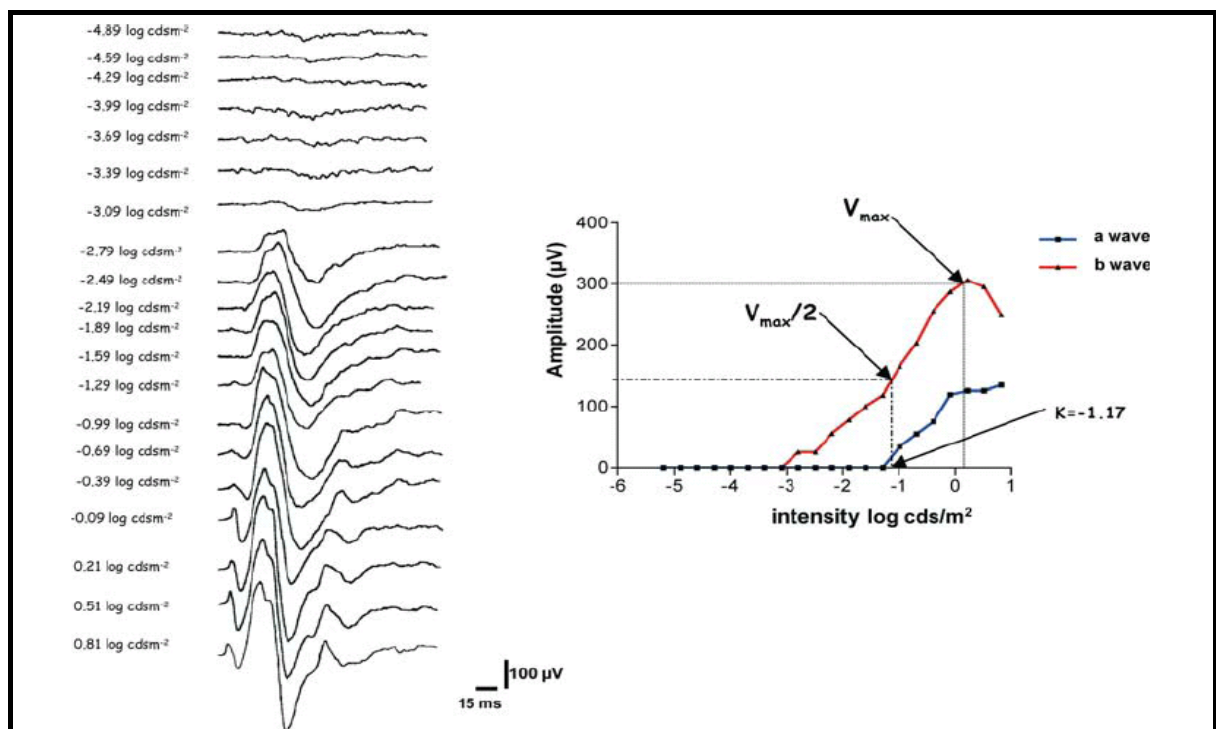


Figura 43: Curvas de luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz ("photopic hill") del perro: trazados de ERG (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas *a* y *b* con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) (Rosolen *et al.*, 2005d).

El origen de este peculiar comportamiento del ERG no se conoce con claridad. Se sabe que no se debe a un progresivo vaciamiento de ciertos elementos retinianos (fotopigmentos, neurotransmisores, etc.), ni a una progresiva inhibición de la respuesta por una sobreestimulación causada por el efecto aditivo de una serie de flashes, ya que el “photopic hill” se presenta tanto con estímulos crecientes en intensidad como con estímulos decrecientes (Wali y Leguire, 1992). Según Rufiange *et al.*, la limitación de la *onda b* llegadas ciertas intensidades de estímulo no depende de la iluminación del ambiente en el que se realiza (siempre que sean ambientes que desensibilizen a los bastones; más de 17 cd/m².s) (Rufiange *et al.*, 2002b; 2003). Apuestan más bien por un mecanismo retinal similar al que limita la formación de la *onda b* en el ERG fotópico, es decir el modelo del “tira y afloja” (push-pull) de las vías ON y OFF (Sieving *et al.*, 1994). En efecto, como ya hemos expuesto anteriormente las vías ON tienden a dar amplitud a la *onda b*, mientras que las vías OFF tienden a restársela (Sieving *et al.*, 1994). Acorde con esto, Rufiange *et al.*, piensan que este modelo de tira y afloja es dependiente de la intensidad de la estimulación, así con flashes poco intensos favorecen las vías ON, mientras que los flashes más fuertes dispararían las respuestas OFF oponiéndose a las ON y dando una *onda b* más baja. Se trataría de un mecanismo intrínseco de limitación de voltaje, específico de los conos. Este mecanismo según los autores protegería las estructuras post-retinales de estímulos no fisiológicos demasiado intensos (Rufiange *et al.*, 2002b; 2003). Sin embargo, esto último no consigue explicar la morfología del “photopic hill” en ciertas patologías retinianas con anomalías de vías ON (Barnes *et al.*, 2002) y/u OFF (Sieving, 1993).

El Vmax en monos y humanos se alcanza con intensidades luminosas (Imax) similares (unos 0,5-0,7 log cd.s/m²). Tras bloquear la actividad eléctrica de células de tercer orden con TTX se reduce la amplitud del PhNR, y a medias y bajas intensidades aumenta la *onda i*. Cuando se eliminan las vías ON con APB, persiste un pico positivo que es la *onda d* cuyo tiempo de culminación aumenta con la intensidad del estímulo, y cuyo Imax con respecto al grupo control es el mismo (unos 0,7 log cd.s/m²) (**figura 44**) (Ueno *et al.*, 2004).

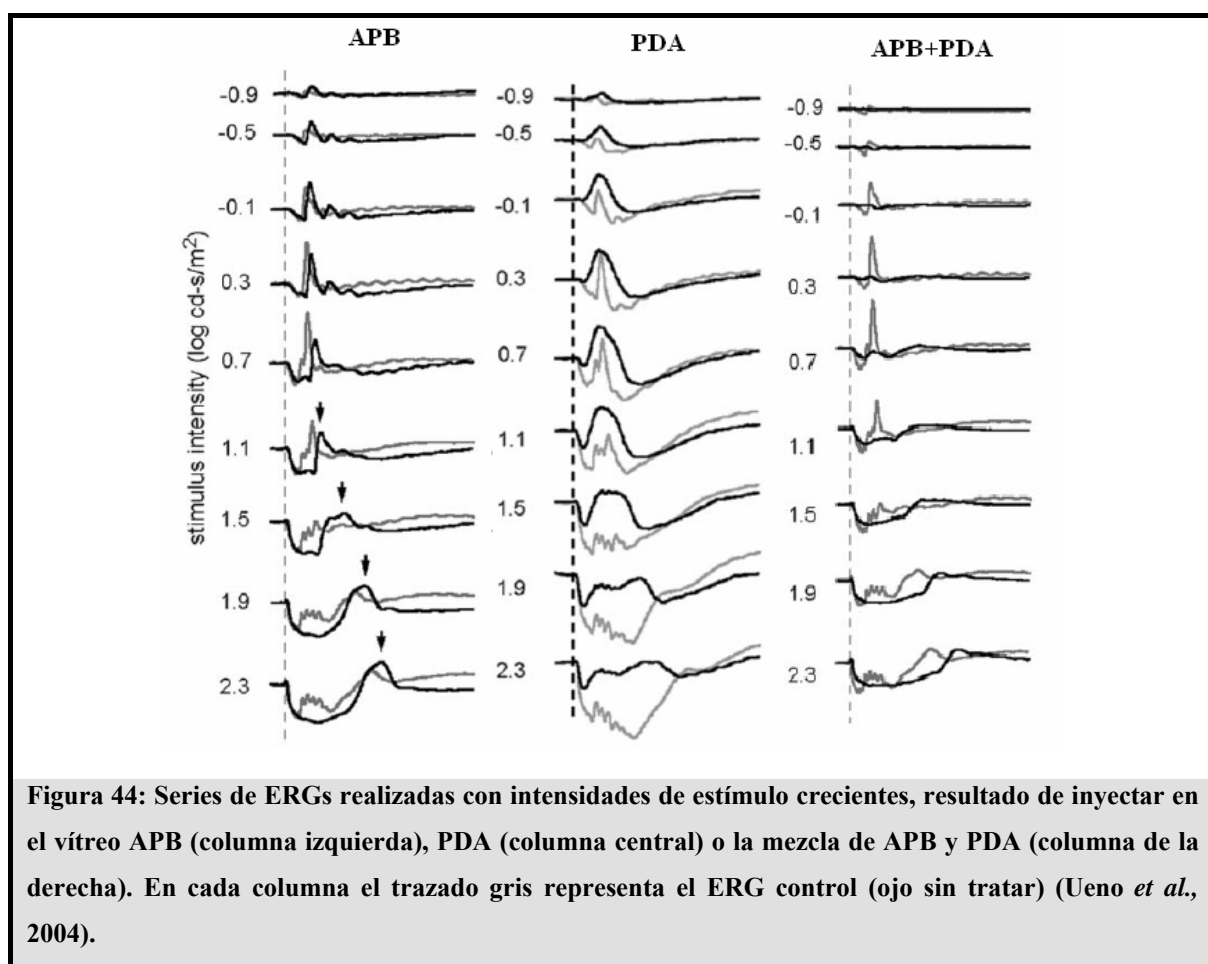
Cuando se bloquean las vías OFF con PDA (**figura 44**), que además bloquea las células horizontales, el “photopic hill” permanece con una Imax similar al grupo control y al grupo con APB, desaparece la *onda i* y aumenta la *onda b* (Ueno *et al.*, 2004).

Cuando se aísla la actividad de los FR con PDA y APB (**figura 44**), desaparece la *onda i* y se observa que la *onda a* empieza a aparecer a intensidades intermedias y aumenta con las altas, confirmando lo que en otros estudios se afirmaba: la *onda a* depende de los FR y de las células postreceptorales (a bajas intensidades fundamentalmente de vías OFF y a altas fundamentalmente de FR) (Bush y Sieving, 1994; Ueno *et al.*, 2004).

Por lo tanto los FR no participan directamente en el “photopic hill” y un posible mecanismo de feed-back de las células horizontales tampoco. Las células de tercer orden no aportan nada al

“photopic hill”. Por último, el retraso en la respuesta de las vías OFF, es decir su desfase con respecto a las vías ON y la disminución de estas últimas al aumentar la intensidad del estímulo son las que provocan el “photopic hill”. El motivo de la disminución de las respuestas ON no se conoce y el retraso en las OFF, según estos autores, puede deberse a un aumento en el tiempo de recuperación de los conos tras estímulos intensos. Por otro lado, esta situación de retraso se puede mimetizar cuando se utilizan estímulos de mayor duración, en esa situación la *onda b* tiende a reducirse debido a que las respuestas OFF se retrasan con respecto a las ON (se desfasan) (Ueno *et al.*, 2004).

El “photopic hill” no varía apenas cuando se utilizan estímulos blancos, verdes o azules, sin embargo, sí lo hace con estímulos rojos en el hombre. Según Ruffange *et al.* esto se debe a que la retina humana es más sensible a las cortas longitudes de onda que a las largas (Ruffange *et al.*, 2005).



2.2.1.4.2.- ERG ESCOTÓPICO:

En condiciones escotópicas se pueden realizar básicamente dos tipos de registros electrorretinográficos en donde predomina el sistema de los bastones: uno con la retina totalmente adaptada a la oscuridad y otro que estudie la propia adaptación a la oscuridad de la retina (AERG) (Yanase *et al.*, 1995; Lazard *et al.*, 2000).

2.2.1.4.2.1.- AERG:

Como se describió anteriormente, cuando la retina está suficientemente adaptada a un nivel luminoso fotópico (por ejemplo 2 horas de luz diurna), la diferencia de potencial del dipolo córnea-retina es estable. Cuando colocamos al animal en un ambiente oscuro los FR de la retina retornan rápidamente a su estado inicial de despolarización y regeneran más lentamente sus fotopigmentos, necesitando para ello obligatoriamente mediación del EPR en el caso de los bastones (Kommonen *et al.*, 1991; Crouch *et al.*, 1996). Estos cambios originan variaciones de potenciales en el EPR que se reflejan sobre los valores del dipolo córneo-retiniano (Steinberg, 1985; Marmor, 1991). Por lo tanto, si se recoge la respuesta electrorretinográfica generada por los bastones durante su adaptación a la oscuridad obtendremos variaciones en amplitud de dichas respuestas que son el reflejo indirecto de la variación del potencial de base del EPR (Steinberg, 1985).

En el hombre se encuentran aumentos de amplitud de las *ondas b* mayores del 30 % que culminan entre el sexto y octavo minuto de adaptación a la oscuridad (correspondientes al DT del EOG) y aumentos en los tiempos de culminación de unos 10 o 12 ms. En el cerdo se han encontrado resultados similares. (Lessel *et al.*, 1993; Rosolen y Lazard, 1997).

En el caso del perro, la culminación de la *onda b* se produce en el minuto 12 y los tiempos de culminación varían menos que los del hombre. Esto no quiere decir que sobre el minuto 8 en el hombre y 12 en el perro, la *onda b* no siga aumentando con el tiempo, sino que en esos tiempos se produce un cambio en la pendiente de la curva que refleja la amplitud de la *onda b* con respecto al tiempo que estos autores relacionan con el DT del EOG (Rosolen *et al.*, 1997; Rosolen y Lazard, 1997; Lazard *et al.*, 2000). En esta línea, Rosolen *et al.*, realizaron un AERG a perros de raza beagle midiendo la amplitud de la *onda b* y su tiempo de culminación en los minutos 0, 2, 4, 8, 16, y 32 (Rosolen *et al.*, 2002). La amplitud de la *onda b* sube durante todo el AERG, así como los tiempos de culminación (**figura 45**) (Rosolen *et al.*, 2002; 2005d).

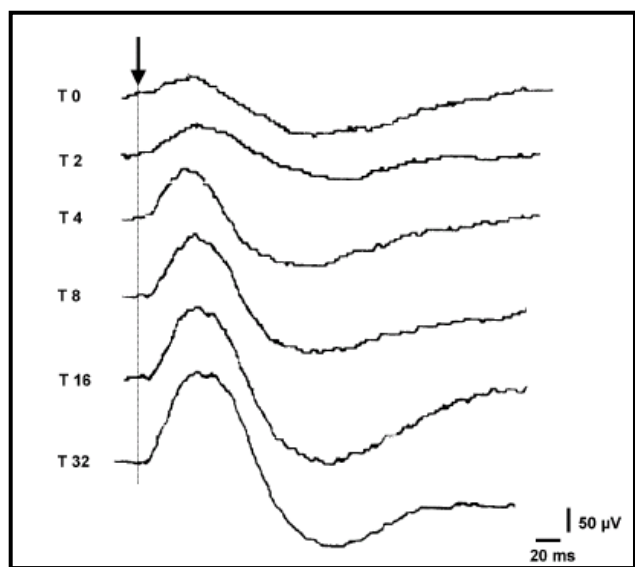


Figura 45: AERG del perro realizado en los tiempos (minutos) 0 (T0), 2 (T2), 4 (T4), 8 (T8), 16 (T16) y 32 (T32) de adaptación a la oscuridad (Rosolen *et al.*, 2005d).

Yanase *et al.*, estudiaron con detalle la adaptación a la oscuridad realizando ERGs con luz azul o roja de baja intensidad durante 91 minutos, tras “blanqueamiento” de los FR con luz intensa durante 10 minutos. Los resultados fueron prácticamente idénticos con los estímulos rojos que con los azules (Yanase *et al.*, 1995). Sin embargo, en el hombre utilizando estímulos rojos, se obtienen curvas durante la adaptación a la oscuridad, distintas que con estímulos azules. Esto es así en el hombre porque tiene conos sensibles a largas longitudes de onda (conos L), que participan en la respuesta, sin embargo el perro no tiene ese tipo de conos (Gouras, 1984; Neitz *et al.*, 1989; Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

En resumen el AERG es un método de aproximación indirecto, pero interesante, al funcionamiento del EPR y del acoplamiento neurorretina-EPR en los animales y también en el hombre, aunque en este se puede valorar fácilmente mediante el EOG (Rosolen *et al.*, 1997; Rosolen y Lazard, 1997; Lazard *et al.*, 2002).

2.2.1.4.2.2.- Curvas de luminancia-respuesta:

Al igual que en el ERG fotópico, en condiciones escotópicas y con la retina adaptada a la oscuridad, se puede realizar una curva luminancia-respuesta. Sin embargo, no se encuentra un fenómeno similar al “photopic hill” descrito anteriormente, en donde la *onda b* aumenta con la intensidad del estímulo hasta cierto punto en el que al aumentar el estímulo la amplitud de la *onda b* comienza a descender (Wali y Leguire, 1992). En efecto, en el caso de retinas adaptadas a la oscuridad, con estímulos crecientes en intensidad la *onda b* aumenta hasta alcanzar su V_{max} (el V_{max} de los bastones). Tanto en el perro como en el hombre, una vez alcanzado el V_{max} de los bastones, si sigue aumentando la intensidad del estímulo, la *onda b* sigue creciendo, pero ahora lo

hace por la contribución de los conos a esos niveles de estimulación (Peachey *et al.*, 1989; Fulton y Hansen, 1988; Yanase *et al.*, 1996). Al contrario que el “photopic hill”, sigue una progresión más o menos lineal que además se puede representar como función hiperbólica y analizar usando la ecuación de Naka-Rushton ($V/V_{\max} = I/(I + k)$), reflejando la distinta naturaleza del ERG de los conos con respecto a la de los bastones. En esta ecuación V y V_{\max} son las amplitudes obtenidas con un estímulo de intensidad I y un estímulo que provoca saturación de la *onda b* respectivamente, k es la constante de semi-saturación y representa el estímulo necesario para alcanzar una respuesta cuya amplitud es la mitad de la amplitud máxima (V_{\max}) (**figura 46**) (Fulton y Hansen, 1988; Wali y Leguire, 1989).

Al contrario que en el “photopic hill” la *onda b* aumenta siempre, asimismo al contrario que en el AERG los tiempos de culminación disminuyen a medida que aumenta la intensidad del estímulo (**figura 46**) (Peachey *et al.*, 1989; Rosolen *et al.*, 2005d).

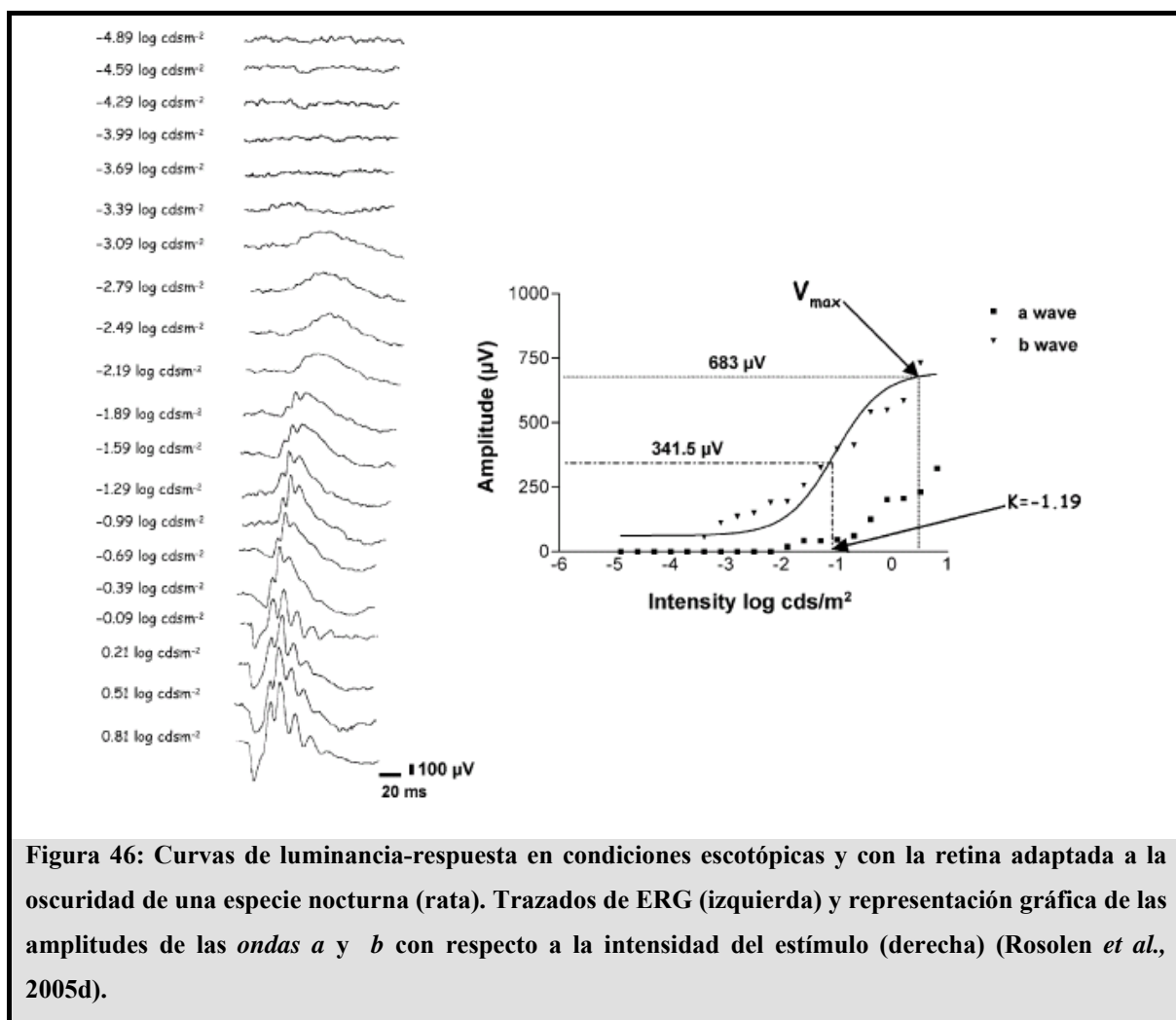


Figura 46: Curvas de luminancia-respuesta en condiciones escotópicas y con la retina adaptada a la oscuridad de una especie nocturna (rata). Trazados de ERG (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las *ondas a* y *b* con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) (Rosolen *et al.*, 2005d).

En el perro, tras blanqueamiento con luz intensa de sus FR, una *onda b* comienza a aparecer con estímulos de más de $-3,2 \log \text{cd.s/m}^2$ y un ambiente totalmente escotópico, y va aumentando a la par que aumenta el estímulo. Sin embargo, si se realiza con ambientes lo suficientemente luminosos como para anular el STR ($-3,5 \log \text{cd.s/m}^2$ o más), la *onda b* comienza a surgir esta vez con estímulos mucho más bajos ($-4 \log \text{cd.s/m}^2$) y sigue aumentando de amplitud con el aumento del estímulo. Esto implica que el STR camufla el verdadero umbral de aparición de la *onda b*. Con este estudio los autores demostraron que en el perro el STR tiene gran influencia en el ERG registrado en condiciones de adaptación a la oscuridad (Yanase *et al.*, 1996).

2.2.1.5.-ANÁLISIS DEL ERG:

En la forma básica del ERG de pleno campo se encuentran las *ondas a* y *b* (**figura 19**). La amplitud de *a* se mide desde la línea de base hasta su pico negativo en μV . La amplitud de *b* se mide también en μV desde el pico negativo de *a* hasta el pico positivo de *b*. Las propiedades temporales del ERG se definen generalmente como tiempo de culminación (TC) (“implicit time” o “time to peak”), se miden en ms para las *ondas a* y *b* y representan el tiempo transcurrido entre el inicio del estímulo y el pico de la onda. En ocasiones se mide también la latencia en ms, que representa el tiempo transcurrido entre el inicio del estímulo y el inicio de la onda en cuestión (**figura 47**) (Marmor *et al.*, 2004; Narfström *et al.*, 2002; Rosolen *et al.*, 2005d).

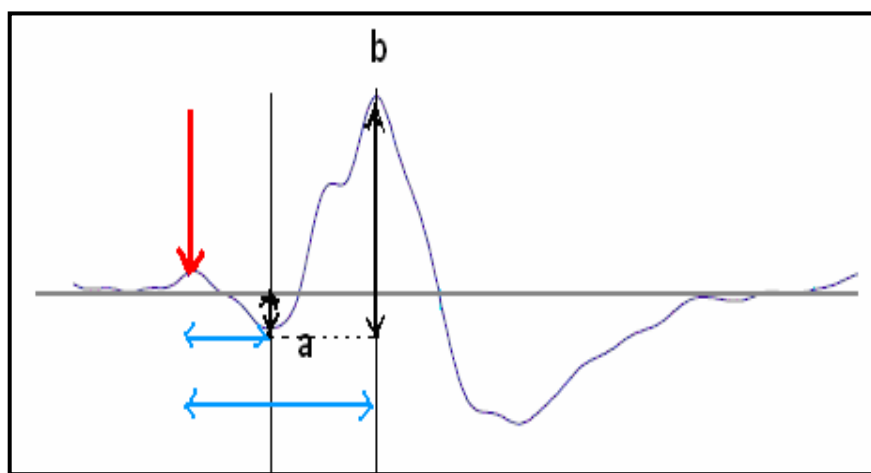


Figura 47: Forma básica del ERG y manera de medir las principales ondas (*a* y *b*). La flecha roja representa el inicio del estímulo, las flechas azules los TC (ms) y las negras las amplitudes (μV).

En cuanto a los potenciales oscilatorios se suelen considerar solamente los tres más grandes (OP2, OP3 y OP4), midiendo su amplitud desde la línea de base o desde el pico negativo anterior a cada uno, asimismo se suele medir la suma de las amplitudes de todos ellos. Ciertos autores valoran la posibilidad de medir también su latencia. En el flicker se suele medir la amplitud de pico a pico en microvoltios (Rosolen *et al.*, 2005d).

Para las curvas de luminancia respuesta en ojos adaptados a la luz (“photopic hill”) o a la oscuridad se usan una serie de descriptores que expusimos anteriormente (Fulton y Hansen, 1988; Rufiange *et al.*, 2003).

El análisis del ERG basado solamente en la amplitud de las *ondas a* y *b* puede llevar a interpretaciones erróneas, si las pupilas no están completamente dilatadas o si se utilizan electrodos de distinto tipo (Lazard *et al.*, 2000; Mentzer *et al.*, 2005). Este es un hecho que puede afectar a la repetibilidad y al intercambio de información entre distintos clínicos y/o investigadores. Una manera de solventar este problema es comparar la relación entre la *onda b* y la *a*. Así la relación *b/a* se mantiene aun cuando se utilizan electrodos de distinto tipo o cuando el tamaño pupilar fue distinto en la realización del ERG. De la misma manera esta relación puede ayudarnos a distinguir en que grupo celular se encuentra el problema ya que los orígenes de ambas ondas son distintos (Perlman, 1983).

En general en todo trabajo o informe clínico relacionado con la electrorretinografía la forma en la que se han realizado las mediciones debe ir indicada (Narfström *et al.*, 2003; Marmor *et al.*, 2004; Rosolen *et al.*, 2005d).

2.2.1.6.- USO CLINICO DE LA ELECTORRETINOGRAFÍA:

El uso de las técnicas electrorretinográficas para el diagnóstico oftalmológico en veterinaria aporta un apoyo como técnica complementaria, al mismo nivel que la angiografía fluoresceínica o la ecografía, siempre después de haber realizado una exploración ocular completa (Narfström, 2002). En determinadas patologías se hace imprescindible para realizar un diagnóstico temprano. Es el caso de la degeneración progresiva de retina que es una forma de alteración de los FR similar a la retinitis pigmentaria descrita en humanos (Narfström y Wrigstad, 1999; Alexander *et al.*, 2003), así en las más de 20 razas de perros estudiadas, siempre los cambios en el ERG aparecen mucho antes que los signos clínicos (**tabla 1**) (Acland, 1988; Narfström y Ekesten, 1999). En el caso de enfermedades hereditarias proporciona una herramienta vital para poder erradicar la patología (Acland *et al.*, 1988; Narfström y Ekesten, 1999). Otra importante aplicación es la del diagnóstico de la degeneración súbita retiniana adquirida, en la que el fondo de ojo presenta un aspecto normal mientras que el ERG es plano (Cullen y Grahn, 2002).

Tabla 1: Afecciones retinianas comunes en distintas razas de perro (adaptado de: Narfström y Ekesten, 1999).

RAZA	TIPO DE AFECCIÓN RETINIANA	ALTERACIONES ERG/EDAD DE APARICIÓN	EDAD DE APARICIÓN DE LESIONES EN FONDO DE OJO
<i>ALASKAN MALAMUTE</i>	DEGENERACIÓN DE CONOS (hemeralopia)	Ausencia de respuesta de los conos, persistiendo la de los bastones. Aparición 6 semanas	8-29 semanas
<i>CANICHES ENANOS Y TOYS</i>	DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE CONOS Y BASTONES	Alteración respuesta de los bastones y luego de los conos. A los 9 meses	3-5 años
<i>LABRADOR RETRIEVER</i>	DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE CONOS Y BASTONES	↓ amplitud de la onda b, ↑ tiempo de culminación de la respuesta de los bastones, importante al año y medio. Menor disminución en la respuesta de los conos.	3-6 años
<i>COCKER SPANIEL AMERICANO</i>	DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE CONOS Y BASTONES	Descenso en la respuesta de los conos y mayor reducción de los bastones. A los 9 meses.	2 y medio-3 años
<i>COCKER SPANIEL INGLÉS</i>	DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE CONOS Y BASTONES	Afectación inicial de los bastones y luego de los conos que alcanzan un menor descenso. Entre 2 y 3 años.	3-8 años
<i>AKITA</i>	ATROFIA PROGRESIVA DE RETINA	Descenso de la actividad de los conos y más importante de los bastones. Aparecen a partir del año y medio.	1-3 años
<i>TECKEL PELO LARGO</i>	ATROFIA PROGRESIVA DE RETINA	A las 17 semanas, ↓ la amplitud y ↑ los tiempos de culminación mayor en los bastones.	6 meses
<i>PAPILLON</i>	ATROFIA PROGRESIVA DE RETINA	Alteración de la respuesta mayor en bastones que en conos. Entre los 9 meses y el año y medio.	1-5 años
<i>TIBETANO SPANIEL</i>	ATROFIA PROGRESIVA DE RETINA	Descenso en la respuesta de los conos y mayor reducción de los bastones, que se manifiesta en el ERG al año y medio.	3-5 años
<i>SETTER IRLANDES</i>	DISPLASIA DE BASTONES TIPO 1	En el ERG disminuye la respuesta de los conos y está ausente la de los bastones a las 6 semanas.	16 semanas
<i>COLLIE</i>	DISPLASIA DE BASTONES TIPO 2	En el ERG disminuye la respuesta de los conos y está ausente la de los bastones a las 6 semanas.	16 semanas

HUSKY SIBERIANO	DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE RETINA LIGADA AL CROMOSOMA X	Descenso en la respuesta de los conos y mayor reducción de los bastones al año.	2 años
SCHNAUZER ENANO	DEGENERACIÓN DE FOTORRECEPTORES	Disminuye la respuesta de los fotorreceptores (igual de conos y bastones) a las 6 semanas.	Entre año y medio y los 5 años
COLLEY, PASTOR DE SHETLAND, BORDER COLLIE, GOLDEN RETRIEVER, LABRADOR.	DEGENERACIÓN DEL EPR	7-12 meses, ↓ amplitud, alteraciones en el AERG	18 meses a 7 años, manchas en la zona tapetal

Tabla 1: Afecciones retinianas comunes en distintas razas de perro (adaptado de: Narfström y Ekesten, 1999).

Además del estudio de patologías, el estudio electrofisiológico de la retina se hace para determinar la toxicidad de determinados fármacos y el seguimiento de las lesiones provocadas (Rosolen *et al.*, 2005d). Algunos ejemplos son los antipalúdicos de síntesis, la clorpromazina, la tioridazina, la indometacina, la quinina, etc. (Novack, 1997). Así mismo las quinolonas utilizadas con frecuencia en veterinaria pueden tener gran toxicidad retiniana, sobre todo en gatos, provocando ceguera irreversible en la mayoría de los casos (Wiebe y Hamilton, 2002). La vigabatrina, fármaco utilizado para tratar la epilepsia, también provoca daños retinianos fundamentalmente a nivel de las células de Müller que se pueden monitorizar con el ERG (Ponjavic *et al.*, 2004).

Otra utilidad en clínica veterinaria es el estudio preoperatorio de los pacientes que padecen cataratas, para determinar la función de la retina ante la imposibilidad de exploración directa del fondo de ojo y, aún siendo esta posible, para diagnosticar degeneraciones de forma más precoz (Narfström *et al.*, 2002; Komaromy *et al.*, 1998). Por último, el ERG puede resultar útil en situaciones de alteración del comportamiento en carnívoros o en équidos cuyos defectos visuales pueden causar alguna forma de agresividad o comportamiento anómalo, pudiendo así realizar el diagnóstico diferencial con otros procesos (Lazard *et al.*, 2000).

2.2.1.7.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO

ELECTRORRETINOGRÁFICO:

La más importante es el efecto masa, ya que el ERG traduce la actividad eléctrica del conjunto de elementos que constituyen la retina, por ello podemos encontrarnos con el caso de un ojo patológico con un ERG normal. Esto es debido a que el trazado de un ERG es la respuesta de la mayoría de los FR, pudiendo quedar minimizadas las lesiones de un número limitado de ellos. Así,

una lesión en el polo posterior de unas 3 veces el diámetro papilar provocada con láser, no produce cambios en la amplitud del ERG (Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

Otra limitación importante es la de valorar la funcionalidad de las células ganglionares. En efecto, salvo determinados estudios que hablan de la relación de la *onda i* y de la PhNR con la actividad de las células ganglionares (Viswanathan *et al.*, 1999; Rosolen *et al.*, 2004b), la idea general es que para valorar la integridad de las células ganglionares resulta mucho más significativo el PERG que el ERG (Rousseau *et al.*, 1996; Holder, 2001; Atilla *et al.*, 2006; Parisi *et al.*, 2006).

2.2.2.- ELECTORRETINOGRAMA FOCAL (fERG) Y MULTIFOCAL (mfERG):

Una de las limitaciones del ERG tradicional de pleno campo es que el registro es una respuesta en masa de la totalidad de la retina. Esto quiere decir que el ERG traduce la actividad de gran parte de los elementos que constituyen la retina. Por lo tanto no es extraño que un fondo de ojo con lesiones más o menos amplias tenga un ERG normal. Podemos afirmar que el trazado de un ERG es la respuesta de la mayoría de los FR, y por tanto, pueden quedar ocultas lesiones que afecten a un conjunto mínimo de los mismos. Esto cobra mayor importancia cuando dichas lesiones se localizan en macula o en *área centralis* en los animales (Benítez del Castillo *et al.*, 2002).

Hoy en día existe la posibilidad de realizar un fERG para examinar la función de una zona concreta de la retina, en particular de la mácula en el hombre. Dada la gran transmisión de luz dentro de la retina, es complicado estimular de manera selectiva los conos maculares, pero con ayuda de ordenadores que promedian respuestas muy pequeñas y utilizando sistemas, que con visualización directa permiten dirigir un estímulo en forma de flicker sobre mácula, es posible obtener una respuesta focal de la zona central, muy útil para detectar una afectación incipiente de la zona (Fish *et al.*, 1986).

El mfERG es una variante del anterior. Se trata de una técnica reciente, que permite hacer un mapa de las respuestas eléctricas de la retina central hasta los 20 grados paracentrales. Con este método se pueden obtener ERGs de un centenar de pequeñas áreas retinales (100 μ m) simultáneamente en menos de 10 minutos por ojo (Marmor *et al.*, 2003).

Para algunos autores no es una prueba que permita detectar alteraciones en la retina interna (células ganglionares) (Hood *et al.*, 2000), sin embargo para otros sí tendría cierta utilidad (Raz *et al.*, 2002). Este examen requiere una completa colaboración por parte del paciente. En los animales sigue siendo una herramienta de los investigadores sin aplicación en la clínica corriente (Raz *et al.*, 2002).

2.2.3.- ERG A PATRÓN (PERG):

Salvo recientes estudios que relacionan ciertos componentes del ERG flash con capas internas de la retina (*onda i*, PhNR) (Rousseau *et al.*, 1996; Rosolen *et al.*, 2004b; Rangaswamy *et al.*, 2004) está bastante reconocido que las células ganglionares aportan muy poco o nada al ERG flash convencional (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström, 2002; Ofri, 2002; Mora y Aregall, 2005). El PERG es pues, la mejor prueba para valorar la funcionalidad de las células ganglionares, en enfermedades del NO (Atilla *et al.*, 2006) o en el glaucoma por ejemplo (Holder, 2001; Parisi, 2006).

En el trazado típico del PERG encontramos dos o tres (según autores) elementos separados. Una onda precoz positiva, llamada **P50** con una culminación de entre 40 y 60 milisegundos, que se considera asociada con la **luminancia** del estímulo, aunque parcialmente puede estar originada por las células que generan el ERG-flash. Es seguida de una inflexión negativa, la onda **N95** con culminación de entre 90 y 100 ms, que está estrechamente relacionada con el **contraste** y con los factores específicos del estímulo. Algunos autores describen como la onda más precoz a una pequeña inflexión negativa que llaman **N35** (**figura 48**) (Bach *et al.*, 2000).

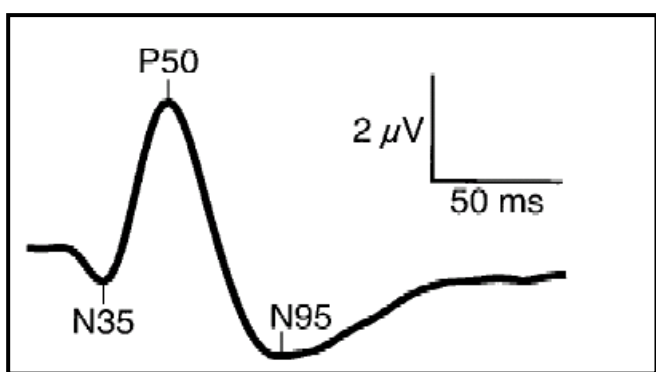


Figura 48; Trazado típico del PERG (Bach *et al.*, 2000).

De los trabajos de Maffei y Fiorentini se sabe que el origen del PERG se halla en las células ganglionares. Tras sección del NO en el gato y en el mono observaron como se mantenían normales los trazados del ERG-flash, así como, los del propio PERG. Pasados cuatro meses el ERG-flash permanecía normal, mientras que el PERG había desaparecido. Esta circunstancia coincide con la aparición de una degeneración retrógrada del NO que implica a las células ganglionares (Maffei y Fiorentini, 1981; Maffei *et al.*, 1985).

Es un examen difícil de realizar en animales debido a su realización técnica y a la obligación de corregir cualquier error de refracción, con lo que sigue siendo una herramienta propia de los investigadores (Maffei y Fiorentini, 1981; Maffei *et al.*, 1985; Lazard *et al.*, 2000). En esta línea se

han realizado PERGs en perros con glaucoma inducido, obteniéndose ondas con similar morfología a las obtenidas en humanos (Sasaki *et al.*, 1998; Hamor *et al.*, 2000).

2.3.- POTENCIALES EVOCADOS VISUALES (PEV):

La llegada de un influjo nervioso aferente a nivel de las áreas corticales visuales entraña una variación de su potencial eléctrico. Esta variación de potencial se denomina potencial evocado visual (PEV) y se puede decir que no es más que la respuesta eléctrica de la corteza provocada por estímulos visuales (Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002; Odom *et al.*, 2004).

Aportan información muy interesante sobre el funcionamiento de la mácula y de las vías de conducción en el hombre en donde este examen está bien definido (Odom *et al.*, 2004; Atila, 2006). En los animales se utilizan actualmente los PEV principalmente con fines experimentales. El número de ondas varía según el individuo y la especie, así como, de la localización de los electrodos (Sasaki *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000).

3.- FACTORES QUE AFECTAN AL REGISTRO DEL ERG:

Para que el ERG sea una herramienta útil, tanto a nivel clínico como experimental, es imprescindible conocer los múltiples factores que afectan tanto a su morfología como a su amplitud y latencia. En efecto, el ERG presenta características constantes frente a condiciones de examen determinadas y también constantes. Muchos son los factores que van a modificar el ERG. Estos factores de variación se podrían dividir en controlables (tipo de iluminación, de electrodos, anestesia...) y no controlables (raza, especie, edad, patologías...) (Komaromy *et al.*, 1998, Sloan, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström, 2002; Ofri, 2002; Mora y Aregall, 2005).

3.1.- FACTORES CONTROLABLES:

3.1.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA ESTIMULACIÓN LUMINOSA:

La luz, al igual que las ondas de radio, los rayos x o los gamma son una forma de energía. No toda la luz emitida por una fuente llega al ojo y produce sensación luminosa. Todo esto se ha de evaluar

de alguna manera y para ello interesa definir algunas magnitudes luminosas: el flujo luminoso, la intensidad luminosa, la iluminancia y la luminancia.

- Se define el **flujo luminoso** como la potencia (en watts o en julios) emitida en forma de radiación luminosa a la que el ojo es sensible, transmitida en el espacio y recibida por una superficie en este caso la retina. Su unidad es el lumen (lm). A la relación entre watts y lúmenes se le llama **equivalente luminoso de la energía**. Los bastones completamente adaptados a la oscuridad transforman 1 watt de luz centrada en 507 nm en 1750 lúmenes. Los conos transforman 1 watt de luz centrada en 555 nm en 680 lúmenes en ambiente diurno (fotópico) (Brigell *et al.*, 1998).
- Se conoce como **intensidad luminosa** al flujo luminoso emitido por unidad de ángulo sólido en una dirección concreta. Su unidad es la candela (cd) (Jaimes *et al.*, 2001).
- Se define **iluminancia** como el flujo luminoso recibido por una superficie. Su unidad es el lux (lx) y equivale a 1 lm/m^2 . Al contrario que la luminancia, la iluminancia, disminuye al aumentar la distancia de la fuente emisora. Existe también otra unidad, el *foot-candle* (fc), utilizada en países de habla inglesa cuya relación con el lux es: $1 \text{ fc} = 10 \text{ lx}$ (Brigell *et al.*, 1998).
- Se llama **luminancia** a la relación entre la intensidad luminosa y la superficie aparente vista por el ojo en una dirección determinada. Su unidad es la cd/m^2 . También es posible encontrar otras unidades como el stilb o el nit (nt) ($1 \text{ nt} = 1 \text{ cd/m}^2$) (**tabla 2**). Tanto en el caso que veamos un foco luminoso (fuente primaria), como en el que veamos luz reflejada procedente de un cuerpo (fuente secundaria) la definición es la misma. Es importante destacar que sólo vemos luminancias, no iluminancias (Brigell *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000).

Multiply number of → To obtain by number of	Candela·m ⁻²	Footlambert	Millilambert	Candela·in ⁻²	Candela·ft ⁻²	Apostilb	Stilb
Candela·m ⁻²	1	3.426	3.183	1550	10.76	0.3183	10000
footlambert	0.2919	1	0.929	452	3.142	0.0929	2919
millilambert	0.3142	1.076	1	487	3.382	0.1	3142
Candela·in ⁻²	0.000645	0.00221	0.00205	1	0.00694	0.000205	6.45
Candela·ft ⁻²	0.0929	0.3183	0.2957	144	1	0.02957	929
apostilb	3.142	10.76	10	4870	33.82	1	31420
stilb	0.0001	0.00034	0.00032	0.155	0.00108	0.000032	1

1 nit = 1 candela·m⁻².

Tabla 2: Factores de conversión de luminancias (Brigell et al., 1988).

El nivel luminoso de los flashes utilizados en electrofisiología se mide en $\text{cd/m}^2 \cdot \text{s}$, que representa el producto de la luminancia por la duración del estímulo en segundos. De modo que un estímulo de $3 \text{ cd/m}^2 \cdot \text{s}$ se corresponde a un estímulo con una luminancia de 3000 cd/m^2 provocada durante 1 ms o de 300 cd/m^2 durante 10 ms (Brigell *et al.*, 1988; Lazard *et al.*, 2000). En la mayoría de la bibliografía viene expresado como el logaritmo en base diez de la intensidad del estímulo, así por ejemplo $6,5 \text{ cd/m}^2 \cdot \text{s}$ se expresa como $0,81 \log \text{ cd/m}^2 \cdot \text{s}$ (Rosolen *et al.*, 2005d).

Existe un concepto muy importante que es el de **iluminación retiniana (IR)** cuya unidad es el Troland (Td), que es definido por la siguiente fórmula: $\text{IR} = 0,36 \times \partial \times S \times L$ en donde ∂ es la transmitancia de los medios transparentes del ojo sin unidades, S la superficie pupilar en mm^2 y L la luminancia de la estimulación en cd/m^2 . Esta fórmula expresa de forma clara la importancia del diámetro pupilar y de la transparencia de los medios. En efecto, una disminución moderada en el diámetro pupilar implica una disminución importante en la IR. Por otro lado una hemorragia en el humor vítreo o un cristalino con catarata madura pueden absorber hasta un 50 % de la luz, lo que corresponde a una atenuación de $0,3 \log$ (Lazard *et al.*, 2000).

La respuesta del sistema visual frente a una radiación electromagnética, en este caso la luz, es restrictiva y no lineal. En efecto, en la mayoría de las especies, la retina es sensible solamente a unas longitudes de onda determinadas, entre 400 y 700 nm en el caso del hombre (Gouras, 1984).

3.1.1.1.- LONGITUD DE ONDA DEL ESTÍMULO:

A **nivel luminoso constante**, la respuesta del sistema visual adopta la forma de una curva de Gauss, son las curvas de eficacia luminosa espectral fotópicas y escotópicas (**figuras 5 y 49**). También se llaman curvas de probabilidad de absorción, ya que representan la probabilidad que tienen los distintos fotopigmentos de absorber esa longitud de onda a un nivel energético determinado (Pepperberg *et al.*, 1978, Gouras, 1984; Neitz *et al.*, 1989).

El hombre tiene tres tipos de conos (somos tricromáticos) según su pico de absorción, conos S, M y L, de corta, media y larga longitud de onda respectivamente (Gouras, 1984), mientras que el perro, así como el zorro, es dicromático, ya que sus conos solo tienen dos tipos de pigmentos, uno con un pico de absorción espectral entorno a los 429 nm (conos S), y otro a los 555nm (conos M) (**figura 5**) (Neitz *et al.*, 1989; Jacobs *et al.*, 1993).

Se pueden también representar las curvas de eficacia luminosa del sistema escotópico (bastones) y del fotópico (de los distintos tipos de conos). La visión escotópica tanto en el perro como en el hombre tiene un pico de absorción entorno a 507 nm, mientras que la escotópica es más baja en los perros al no tener conos L (**figura 49**) (Gouras, 1984; Neitz *et al.*, 1989; Yanase *et al.*, 1996).

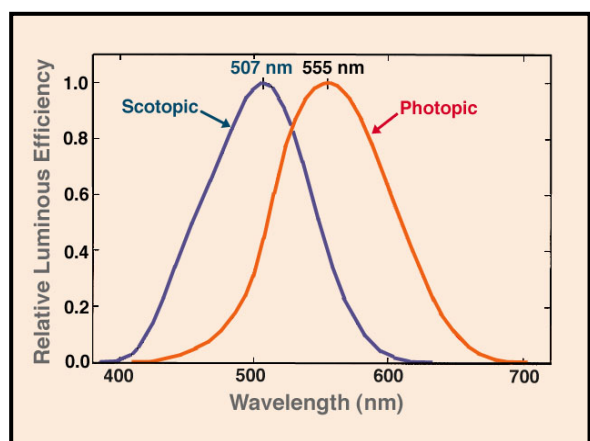


Figura 49: Curvas de eficacia luminosa del sistema fotópico (línea naranja) y del escotópico (línea azul) del hombre (Gouras, 1984).

Modulando el color del estímulo podemos poner más de manifiesto la respuesta de un grupo u otro de conos. En el perro se suelen utilizar estímulos de color azul centrados a 440 nm, de nivel luminoso bajo (por debajo del umbral de los conos, para no estimular a los conos S) para dar preferencia al sistema de los bastones (Lazard *et al.*, 2000; Rosolen *et al.*, 2005d). En humana es frecuente el uso de estímulos azules o rojos (Benítez del Castillo *et al.*, 2002). El rojo no se utiliza en el perro porque en esas longitudes de onda la probabilidad de absorción espectral es baja, al no tener conos L (Neitz *et al.*, 1989; Yanase *et al.*, 1995).

3.1.1.2.- NIVEL ENERGÉTICO DEL ESTÍMULO:

A **longitud de onda constante**, la respuesta del sistema visual varía en función del nivel energético del estímulo. Esto se aprovecha en las pruebas que definen la curva de luminancia-respuesta tanto en ambientes fotópicos (retina adaptada a la luz, “photopic hill”) (Wali y Leguire, 1992) como en escotópicos (retina adaptada a la oscuridad) (Rosolen *et al.*, 2005d).

En el dominio escotópico (menos de $0,001 \text{ cd/m}^2$) es donde los bastones son capaces de percibir energías muy bajas sin posibilidad de percepción coloreada. Para energías superiores (entre $0,001$ y 10 cd/m^2) estamos en el dominio mesópico y se pueden percibir blancos y grises. Con luminancias superiores (más de 10 cd/m^2) entramos en dominio fotópico y la percepción se enriquece de un nuevo parámetro que da origen a la sensación de los colores, ligada al funcionamiento de los conos (**figura 50**). Conviene decir que la visión en color en el hombre es una noción subjetiva en respuesta a un estímulo físico (Gouras, 1984; Lazard *et al.*, 2000).

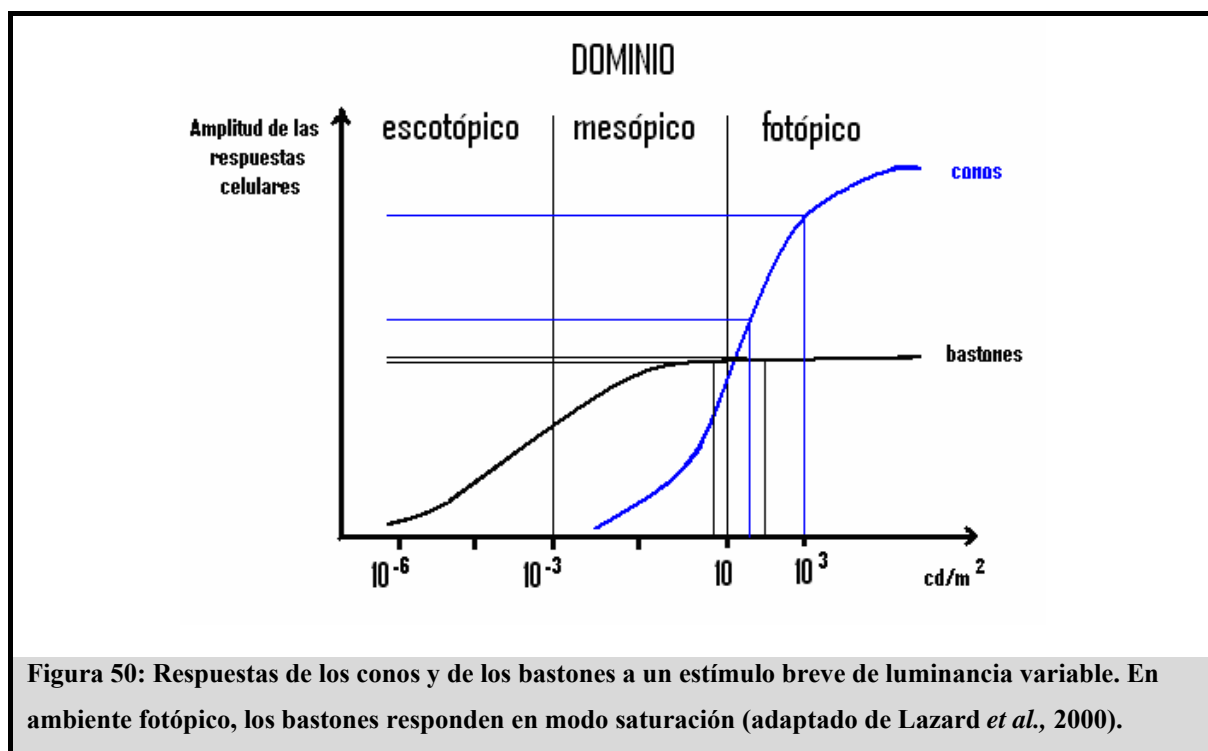


Figura 50: Respuestas de los conos y de los bastones a un estímulo breve de luminancia variable. En ambiente fotópico, los bastones responden en modo saturación (adaptado de Lazard *et al.*, 2000).

En ambientes netamente fotópicos los bastones responden en modo de saturación, es decir su respuesta es la misma aunque se incremente el estímulo, lo cual en electrofisiología es de gran utilidad ya que se puede aislar de esa manera la respuesta de los conos. En efecto, una de las claves de la electrofisiología es la de ser capaz de separar la respuesta de los conos de la de los bastones, ya que muchas patologías afectan de manera selectiva en alguna de sus fases a uno u otro sistema (Narfström y Ekesten, 1999). De la misma manera, en ambientes escotópicos y además utilizando estímulos de baja intensidad luminosa daremos prioridad a la respuesta de los bastones (Lazard *et al.*, 2004; Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004; Rosolen *et al.*, 2005d).

3.1.1.3.- FRECUENCIA TEMPORAL DEL ESTÍMULO:

Otra manera de modular la respuesta de los conos es jugando con la frecuencia temporal del estímulo. Como ya explicamos en capítulos anteriores, hablando del flicker, con frecuencias de estímulo superiores a 20 Hz (20 estímulos por segundo), los bastones no son capaces de responder (Dodt, 1951).

3.1.1.4.- DURACIÓN DEL ESTÍMULO:

También se puede hacer variar la duración del estímulo, así con estímulos prolongados de más de 4 segundos podemos evidenciar la *onda c* del ERG (Steinberg, 1970). Con estímulos de más de 100 ms separamos lo suficiente las fases ON y OFF y se puede apreciar la *onda d* (Bush y Sieving, 1996; Kondo y Sieving, 2001; Ueno *et al.*, 2006). En clínica veterinaria y en investigación los estímulos que más se usan son los estímulos blancos de entre 1 y 10 ms (Narfström, 2002; Rosolen *et al.*, 2005d).

3.1.1.5.- TIPO DE FOTO-ESTIMULADORES:

En la mayoría de los casos para conseguir un ERG de pleno campo (“full-field” ERG) se utiliza un estimulador de tipo Ganzfeld; se trata de una cúpula que proporciona a la vez la luminosidad de ambiente deseada y el propio estímulo, se valoran los dos ojos a la vez a no ser que uno de ellos se mantenga tapado o con los electrodos sin conectar (**figura 51**). Es el que más se usa en humanos (Marmor *et al.*, 2004). En animales de pequeño y mediano tamaño también se usa este u otro sistema similar (Narfström *et al.*, 1995).

Algunos autores han probado un sistema alternativo en perros de raza beagle. Consta de dos fotoestimuladores independientes, muy práctico al permitir estimular un ojo solo de cada vez o los dos juntos (**figura 51**). No observaron diferencias significativas entre ambos ojos en cuanto a las amplitudes de las ondas. Sin embargo, si encontraron mínimas diferencias entre los tiempos de culminación de las ondas de ambos ojos. El estudio concluye que es una manera práctica de obtener ERGs de pleno campo fiables y reproducibles (sobre todo en cuanto a amplitudes) en el perro tanto para clínica como para investigación (Rosolen *et al.*, 2002).

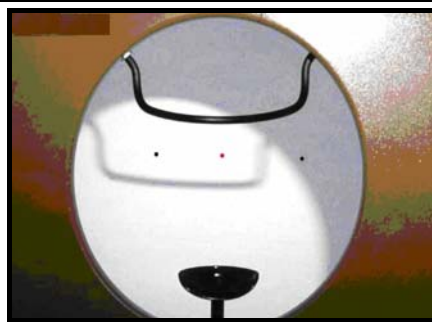


Figura 51: Tipo de fotoestimuladores: binoculares independientes (izquierda) y Ganzfeld (derecha).

3.1.1.6.- LUMINANCIA DEL AMBIENTE:

No es lo mismo realizar un estímulo de 3 cd/m².s en un ambiente escotópico que en un ambiente fotópico. Si lo hacemos en un ambiente escotópico obtendremos la respuesta de los conos, ya que el estímulo es de suficiente intensidad, pero también la de los bastones ya que en ambientes escotópicos no se encuentran saturados y pueden responder de manera medible, se obtiene así la respuesta global de la retina. Por otro, lado si lo que queremos es hacer un seguimiento de la adaptación a la oscuridad de los bastones lo haremos con estímulos suficientemente bajos para que los conos no respondan y en ambiente escotópico para que los bastones no estén saturados. Si queremos ver como los conos se adaptan a distintos ambientes luminosos, debemos utilizar ambientes con luminancia superior a 10 cd/m² para que los bastones estén saturados (Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004; Rosolen *et al.*, 2005d).

El estado de adaptación inicial de la retina, bien a la luz, bien a la oscuridad, es muy importante antes de realizar un examen electrorretinográfico. Un estudio reciente demuestra que se requiere al menos una hora de adaptación a la oscuridad para que la retina se recupere y se pueda obtener respuestas similares a las del grupo control tras exposición a oftalmoscopia indirecta o fotografía de fondo de ojo (Tuntivanich *et al.*, 2005).

3.1.2.- DILATACIÓN PUPILAR:

Como relatamos anteriormente, el tamaño pupilar durante la realización del examen electrorretinográfico es sumamente importante a la hora de obtener resultados fiables y reproducibles (Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004). Para realizar un ERG se debe obtener una midriasis máxima y que dure como mínimo el tiempo que dura el examen. En veterinaria se usa como midriático fundamentalmente la tropicamida, un parasimpaticolítico que bloquea los receptores de acetilcolina de los músculos presentes en el iris. En el perro tiene un inicio de acción rápido (10-15 minutos) y alcanza su efecto máximo a los 30 minutos, durando varias horas. La atropina también es un midriático eficaz, más potente, con un inicio de acción más lento pero con una duración mucho más prolongada que la tropicamida (varios días) (Rubin y Wolfes, 1962). El uso de tropicamida no tiene efectos sobre la presión intraocular (PIO) en el perro (Hacker y Farber, 1988).

Los agentes volátiles utilizados en anestesia tienden a producir midriasis, mientras que el propofol (Larsson *et al.*, 1993) y los relajantes/bloqueantes musculares (Gray *et al.*, 1997) no tienen efecto alguno sobre el tamaño pupilar.

3.1.3.- PROTOCOLOS:

Con lo anteriormente descrito es fácil de entender que en electrofisiología las características del estímulo tienen una importancia vital. Surge por lo tanto la necesidad de estandarizar y definir claramente las características de los estímulos utilizados, así como, otros factores de un completo examen electrorretinográfico. Con ese fin en 1989 la ISCEV elaboró un protocolo estándar de ERG de pleno campo con el fin de hacer este examen lo más reproducible posible. Dicho protocolo está dirigido a la oftalmología humana y ha sido actualizado dos veces. La última versión está disponible desde 2004 (Marmor *et al.*, 2004). En 2002 Narfström *et al.*, hicieron lo propio a través del ECVO para ser aplicado en el perro (Narfström *et al.*, 2002). Las características del estímulo definidas en estos protocolos son similares para el perro y para el hombre. Hay que señalar que son protocolos clínicos que no contemplan por ejemplo el uso de estímulos coloreados (azules o rojos por ejemplo), ni ambientes con luz coloreada (Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004).

Recientemente han sido publicados unos protocolos de ERG para especies animales de experimentación y para estudios toxicológicos. En ese trabajo se separan a las especies de estudio en función de si son diurnas (**figura 52**) o nocturnas (**figura 53**). Siguiendo este protocolo se puede estudiar la funcionalidad de conos y bastones por separado así como su adaptación a la luz y a la oscuridad respectivamente (Rosolen *et al.*, 2005d).

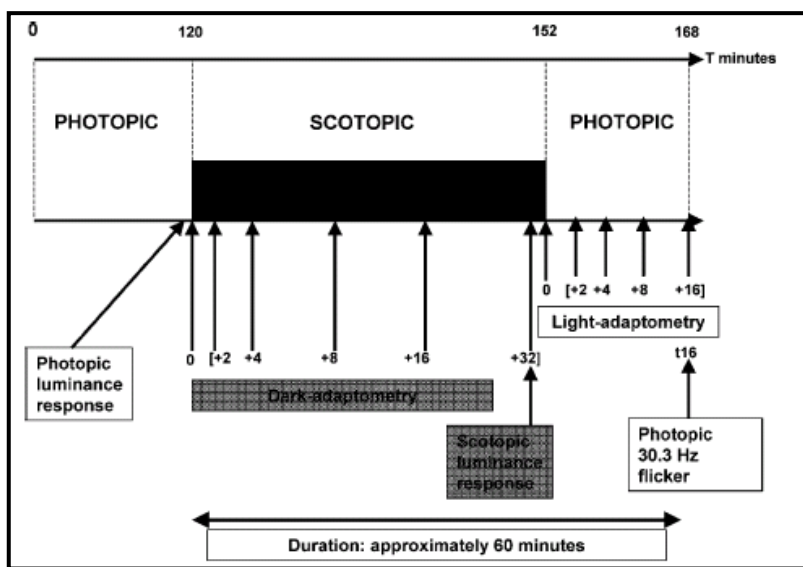


Figura 52: Protocolo electrorretinográfico para especies diurnas (Rosolen *et al.*, 2005d).

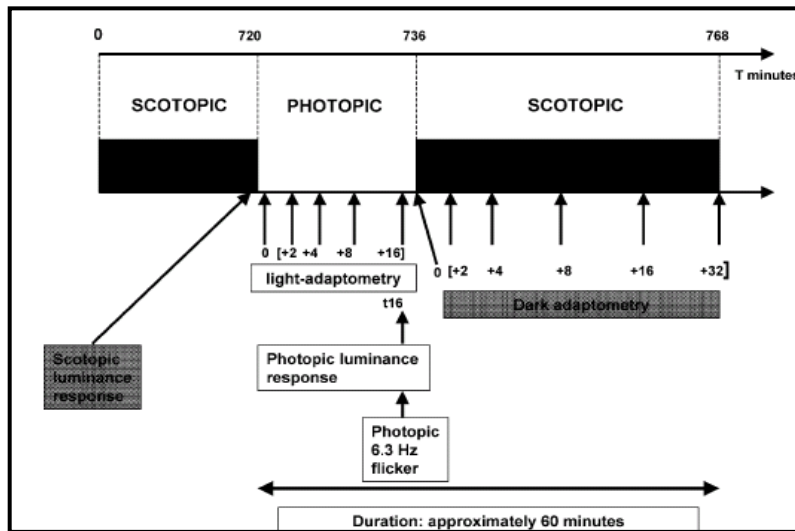


Figura 53: Protocolo electrorretinográfico para especies nocturnas (Rosolen *et al.*, 2005d).

3.1.4.- RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LA SEÑAL:

Es necesario comprender el funcionamiento biológico de las diferentes estructuras del sistema visual **generadoras** de la señal y las diferentes posibilidades de recogida en la periferia mediante los **captore**s de la señal. En efecto, esto puede ser una fuente de variación evitable (Komaromy *et al.*, 2002).

3.1.4.1.- GENERADORES DE LA SEÑAL:

Los generadores biológicos son de dos tipos en función de quien los origina; analógicos o digitales.

3.1.4.1.1.- GENERADORES ANALÓGICOS:

Los **generadores analógicos** son potenciales causados por movimientos iónicos, proporcionales a los fenómenos físicos que los originan, nacen y mueren a nivel local, y decrecen en función de la distancia a la que se recogen. Son representables por un dipolo localizado y de características variables en el tiempo (latencia, tiempo de culminación). Son los FR y las células de las capas intermedias de la retina que se exploran mediante el ERG cuyos orígenes concretos discutimos ampliamente en capítulos anteriores (Brown, 1968; Lazard *et al.*, 2000; Benítez *et al.*, 2002).

3.1.4.1.2.- GENERADORES DIGITALES:

Los **generadores digitales** son las células ganglionares situadas en la capa interna de la retina. Son generadores de potenciales de acción (“spikes”) de frecuencia variable (Mangel, 1991). El estímulo desencadena un fenómeno irreversible, propagado y de amplitud independiente al fenómeno físico que le dio origen, en electrofisiología se explora mediante el PERG (Bach *et al.*, 2000; Holder, 2001). El conjunto de los potenciales generados constituye el potencial global de los nervios que los conducen. Esa conducción por las vías ópticas del mensaje visual, codificado a nivel de la retina y transmitidos al cortex visual primario, se explora mediante los PEV (Sasaki *et al.*, 1998; Odom *et al.*, 2004).

3.1.4.2.- CAPTORES DE LA SEÑAL:

Los **captosres**, comúnmente llamados electrodos, miden las variaciones de campos eléctricos creados por los generadores biológicos y establecen el enlace entre estos y los instrumentos de procesado. Son una parte muy importante del equipo electrorretinográfico, ya que frecuentemente son el origen de variaciones o de disfunciones, por su degradación (oxidación, polarización, conexiones defectuosas...) (Komaromy *et al.*, 2002; Honsho *et al.*, 2004).

Se distinguen tres categorías de electrodos: activos, de referencia o pasivos y de masa. La señal se recoge entre el activo, que se coloca lo más cerca posible de la fuente que origina la señal, y el de referencia, que sirve de referencia eléctrica. El electrodo de masa evita perturbaciones eléctricas uniendo el paciente al aparato (Narfström *et al.*, 2002). Las mediciones se realizan entre el electrodo activo (variable según el estímulo) y el de referencia (no varia sea cual sea el estímulo).

3.1.4.2.1.- ELECTRODOS ACTIVOS:

Normalmente los electrodos activos son monopolares pero los hay bipolares en cuyo caso incorporan una parte activa y otra de referencia (Lazard *et al.*, 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002; Komaromy *et al.*, 2002). Existen diversos tipos de electrodos activos, los más conocidos son:

- Electrodo corneales: el más clásico es el de Allen y Burian, tiene una lente corneal en cuyo interior se realiza la conexión eléctrica. Lleva unos pequeños vástagos que ayudan a mantener los párpados abiertos. Son bipolares, es decir incorporan la parte activa y la de referencia (**figura 54**). Existen otro tipo de electrodos desechables estériles que consisten en una lente que se adapta a la córnea y que lleva un fino anillo de oro en su interior para la conexión con la córnea, son los llamados ERG-jet (monopolares) (**figura 54**). Este tipo de electrodos tienen la desventaja de interferir con el campo visual y de disminuir la cantidad de estímulo que llega a la retina. Si se hace

con el paciente despierto, requiere anestesia de la córnea (Benítez del castillo, 2000; Komaromy *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004).



Figura 54: Electrodo corneales de tipo Allen- Burian (izquierda) y de tipo ERG-jet (derecha).

- Gold-foil de Arden: son unas finas tiras recubiertas de oro que se colocan en el borde del párpado inferior como cuando se hace un test de Schirmer, de manera que no interfieren con el campo visual haciéndolos adecuados para el PERG (**figura 55**). No requiere anestesia de la córnea (Holder, 1988).



Figura 55: Electrodo gold-foil de Arden.

- El electrodo DTL: su nombre viene de quienes lo desarrollaron (Dawson-Trick-Litzkow). Se trata de un fino hilo de nylon recubierto de plata que se deja “flotar” en la lágrima (**figura 56**). No requiere anestesia de la córnea y no interfiere con el campo visual. Este tipo de electrodo ha dado buenos resultados en varios estudios en cuanto a calidad de la señal y reproducibilidad (Herbert *et al.*, 1999). También ha sido empleado en caballos, dando buenos resultados (Komaromy *et al.*, 2003).

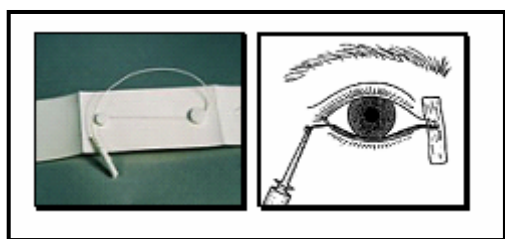


Figura 56: Electrodo DTL (izquierda) y manera de colocarlo (derecha).

- Electrodo conjuntivo-escleral: está formado por un gancho de cobre retráctil que se encuentra dentro de una vaina de plástico. Se colocan en la conjuntiva bulbar a nivel del limbo (**figura 57**). Son de gran utilidad en veterinaria, ya que no interfieren con la visión, impiden movimientos

oculares y mantienen los párpados abiertos. Son más traumáticos que el resto (Rosolen *et al.*, 1998). Han sido utilizados en varios trabajos publicados, dando muy buenos resultados tanto en el perro como en el gato (Lazard *et al.*, 2000, Rosolen *et al.*, 2002; 2004b).

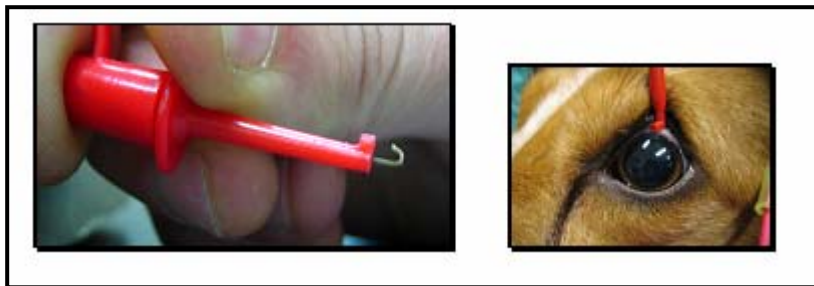


Figura 57: Electrodo conjuntivo-escleral (derecha) y colocación en la conjuntiva escleral cerca del limbo.

3.1.4.2.2.- ELECTRODOS DE REFERENCIA Y DE MASA:

En el hombre son similares a los utilizados para electrocardiografía (**figura 58**) (Benítez del Castillo *et al.*, 2002). En los animales para evitar interferencias y malos contactos debido al pelo se utilizan electrodos de aguja que se implantan a nivel subcutáneo. Son agujas esterilizables similares a las de acupuntura (**figura 58**) (Komaromy *et al.*, 2002; Lazard *et al.*, 2000).

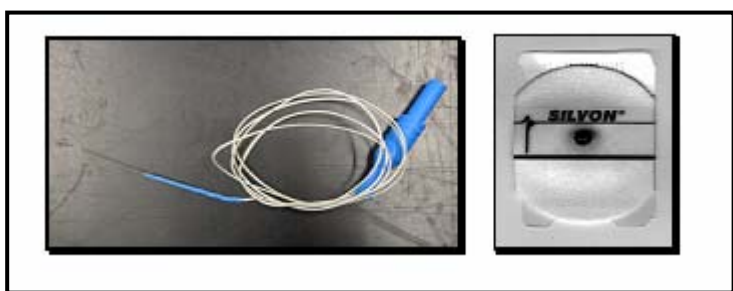


Figura 58: Electrodeos de referencia y de masa utilizados en el hombre (derecha) y en los animales (izquierda).

Es importante, en la medida de lo posible, utilizar siempre el mismo tipo de electrodos y colocarlos en las mismas posiciones ya que existen variaciones, sobre todo en la amplitud de los trazados del ERG obtenidos en función del tipo de electrodo activo utilizado, así como la posición del mismo con respecto al de referencia (Mentzer *et al.*, 2005).

Como norma general sea cual sea el electrodo utilizado, este debe tener poca impedancia (mínima resistencia al paso de la electricidad), menos de 5 k Ω según la ISCEV (Marmor *et al.*, 2004) y el ECVO (Narfström *et al.*, 2002).

En el perro el electrodo activo debe colocarse a nivel corneal (electrodo de tipo lentilla; ERG-jet o de tipo Allen-Burian) (Narfström *et al.*, 2002), o en la conjuntiva bulbar a nivel de limbo (electrodo conjuntivo-escleral) (Rosolen *et al.*, 2002; 2005d). Los de referencia en el caso en que el activo no

los incorpore (electrodos bipolares) serán colocados a medio camino entre el canto temporal y la oreja de cada lado. El de masa se puede colocar en el espacio interescapular. Tanto los electrodos de referencia como el de masa se insertan a nivel subcutáneo a través de una aguja hipodérmica de unos 18 gauges (Narfström *et al.*, 2002) y evitando el contacto con músculos, ya que pueden dar interferencias (Komaromy *et al.*, 2002).

3.1.4.3.- TRATAMIENTO DE LA SEÑAL:

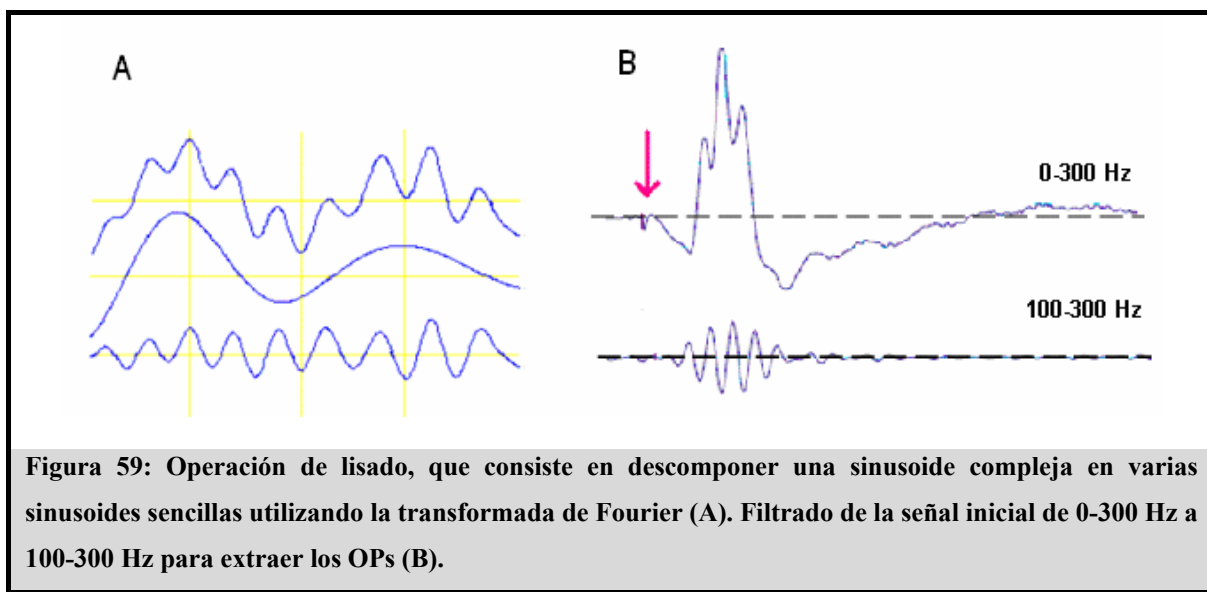
Los métodos de registro y de tratamiento de la señal son de suma importancia, ya que recogen la actividad en el tiempo de muchas células a nivel de los electrodos de registro. La magnitud y la polaridad de esas respuestas pueden estar influenciadas por los métodos de registro y los equipos utilizados, así como, por factores dependientes del animal. Estos últimos son los que interesan, ya que son los que permiten sospechar o no de determinadas patologías (Komaromy *et al.*, 1998; 2002).

La cadena de electrofisiología recoge las señales a través de los electrodos (captore). Son señales débiles y contaminadas que provienen de varios generadores. El tratamiento de la señal apunta a seleccionar, filtrar y amplificar el conjunto de las señales recogidas con el fin de aislar y convertir en interpretable la señal que proviene de un grupo en concreto de generadores biológicos (Lazard *et al.*, 2000). La amplificación es indispensable para transformar las señales biológicas débiles en señales lo suficientemente fuertes como para ser estudiadas. La señal que sale del amplificador es igual a la que entra multiplicada por la ganancia (regulable) del amplificador: **S (señal de salida) = E (entrada) x G (ganancia)**. En biología se utilizan amplificadores diferenciales que solo amplifican las diferencias de tensión. El inconveniente es que amplifican las diferencias de tensión tanto de la señal biológica útil como de la parásita (ruido). En efecto, hay muchos tipos de señales parásitas que nos pueden contaminar nuestra lectura: actividad del corazón (electrocardiograma; ECG), del cerebro (electroencefalograma; EEG), de los músculos, de aparatos eléctricos conectados cerca, etc. Las señales propias del ERG estarán cerca del electrodo activo y lejos del de referencia, mientras que normalmente el ruido está en ambos, de esa manera el aparato amplifica selectivamente las señales que aparecen en uno u otro electrodo pero no las comunes a los dos (ruido), este proceso en inglés se conoce como: **common mode rejection (CMR)** (Komaromy *et al.*, 2002).

Para que el CMR funcione correctamente, el electrodo activo y los de referencia deben tener impedancias similares. Además hay que señalar que toda señal próxima al electrodo de referencia que no lo esté del activo, como por ejemplo actividad muscular, también será amplificada. Por lo tanto, no es una garantía absoluta de eliminación completa de ruido aunque sí es de gran ayuda.

Además están provistos de filtros electrónicos regulables que eliminan parte de los parásitos, eliminando las frecuencias que no están comprendidas dentro de las de la señal que queremos estudiar (Brigell *et al.*, 1998).

Cada amplificador tiene una banda pasante comprendida entre 1 y como mínimo 300 Hz. Esta banda pasante es regulable de manera que si queremos recoger por ejemplo PEV basta con ajustarla entre 1 y 70 Hz y si solo nos interesan los OPs basta con ajustar el filtro entre 100 y 300 ya que por debajo de 100 Hz no aparece ningún OP (**figuras 26 y 59**) (Narfström, 2002). La mayoría de los aparatos poseen además un filtro automático que elimina todas las señales que contengan 50 Hz, ya que esa frecuencia es la usada por cualquier instalación eléctrica en Europa (en América suele ser 60 Hz) y es por lo tanto susceptible de producir parásitos. Estos filtros de frecuencia pueden actuar en el momento de recoger la señal (filtros analógicos) o una vez recogida (numéricos) (Komaromy *et al.*, 2002). En la práctica es mejor recoger la señal sin filtrar y hacerlo después si es necesario mediante un proceso que se llama lisado. Generalmente el lisado que permiten realizar estos aparatos utiliza la transformada de Fourier que descompone la señal biológica en cierto número de sinusoides (**figura 59**) (Bach *et al.*, 1999).



El último proceso que deben realizar estos aparatos es la conversión de la señal analógica obtenida (señal biológica e inevitablemente algo de ruido a pesar del CMR) en señal digital. La señal última obtenida puede no ser discernible del ruido con lo que es indispensable extraerla realizando una mejora de la relación señal/ruido. En efecto, cuando hacemos n estímulos repetidos se postula que la señal biológica generada es idéntica en cada uno de esos n estímulos mientras que el ruido es aleatorio. Así repitiendo n veces el estímulo se recoge n veces la misma señal biológica y distinto ruido, con lo que efectuando la suma y media de estas n señales la amplitud de la señal biológica

presenta una mejora proporcional a la raíz cuadrada de n mientras que el ruido (aleatorio) es cada vez de menor amplitud. En el caso del ERG la señal está bastante desprovista de ruido y es amplia con lo que basta una mejora señal/ruido de 3 a 4, con lo que entre 9 y 16 estímulos suelen ser suficientes. Sin embargo, los PEV a flash son de muy débil amplitud y están “ahogados” en el ruido provocado en este caso por el EEG, con lo que se necesita una mejora señal/ruido grande, del orden de 8 a 10 (entre 64 y 100 estímulos) (Lazard *et al.*, 2000).

3.1.4.4.- FUENTES DE RUIDO:

Las mayores fuentes de ruido son las líneas eléctricas (50 o 60 Hz), el propio amplificador, actividad fisiológica del animal distinta a la que queremos medir, problemas en los electrodos y mala calidad de la toma de tierra. Generalmente los aparatos vienen provistos de un filtro automático de 50 o 60 Hz según la zona, que minimiza las interferencias que las líneas eléctricas pueden tener sobre el animal o el amplificador (fenómenos de capacitancia e inductancia). La actividad fisiológica que puede alterar los trazados del ERG es básicamente la que originan los músculos cardíaco y esquelético, frutos estos últimos de una deficiente relajación muscular y/o sedación del animal (**figura 60**). Este tipo de ruido es problemático sobre todo cuando se origina en proximidad del electrodo de referencia ya que no puede ser descartado por el CMR (Komaromy *et al.*, 2002).

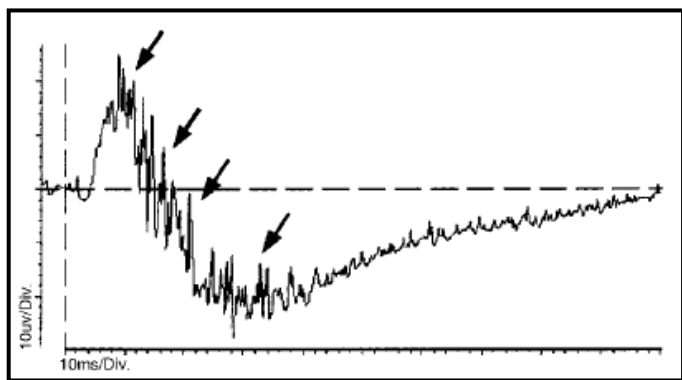


Figura 60: ERG recogido en un perro con sedación insuficiente. La señal está muy contaminada debido a la actividad muscular (flechas) (Komaromy *et al.*, 2002).

Los electrodos recogen potenciales en su superficie y en ocasiones pueden estar en contacto con fluidos extracelulares o sudor lo cual puede originar ruido. Esto sucede cuando los electrodos se mueven o están en mal estado (sucios, polarizados, rotos...). Atendiendo a lo anterior y con el fin de evitar en la medida de lo posible interferencias que puedan falsear resultados, se aconseja la anestesia general de los animales además de limpieza, cuidado y correcta colocación de los electrodos. Asimismo se recomienda reducir en la medida de lo posible los aparatos eléctricos en funcionamiento dentro o cerca de la sala de exploración (Brigell *et al.*, 1998; Komaromy *et al.*, 1998; 2002).

3.1.5.- RITMOS CIRCADIANOS:

La influencia de los ritmos circadianos ha sido bastante estudiada en el hombre y en el mono, demostrando que la amplitud del ERG es menor cuando la concentración de melatonina es mayor, sobre todo las dependientes de conos (Rufiange *et al.*, 2002a). No obstante parece que tales variaciones no tienen significación clínica para la mayoría de pacientes, no siendo relevante el momento del día en el que se realice el examen siguiendo los protocolos de la ISCEV (Marcus *et al.*, 2004).

3.1.6.- ANESTESIA:

Este apartado es importante, ya que en el caso de los animales es casi siempre imprescindible recurrir a la anestesia más o menos profunda para realizar estudios electrofisiológicos. En efecto, el registro de señales eléctricas relacionadas con el sistema visual en el hombre o en el animal no es particularmente doloroso pero requiere cierto grado de cooperación. En el caso del animal, que suele estar inquieto y sorprendido ante las manipulaciones llevadas a cabo, dicha cooperación es mínima. Por lo tanto el recurso a la anestesia general es inevitable salvo en contadas excepciones (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002). Podemos encontrar así trabajos realizados sobre cerdos despiertos que suelen ser bastante cooperadores y cuyos ojos tienen una movilidad bastante limitada (Rosolen y Lazard, 1997).

Asimismo, en el caso de los roedores se pueden utilizar sistemas de contención adecuados para realizar ERGs sin necesidad de dormirlos (Lazard *et al.*, 2000). En la bibliografía se puede encontrar técnicas para realizar ERGs y PEV a perros despiertos, pero requiere adiestramiento específico de los mismos con lo que su uso clínico es prácticamente nulo (Sato *et al.*, 1982). También algunos autores realizaron de manera fiable ERGs a monos despiertos (Sato *et al.*, 1980).

En el caso del perro según Komaromy *et al.*, para protocolos cortos se puede recurrir a la sedación con acepromacina y butorfanol pero para protocolos largos es necesaria la anestesia general (Komaromy *et al.*, 1998). En el hombre se suele recurrir a la sedación o anestesia general en el caso de pacientes con desórdenes psiquiátricos o en niños, cuya cooperación en ocasiones es escasa (Wongpichedchai *et al.*, 1992; Tremblay y Parkinson, 2003; Marmor *et al.*, 2004).

En definitiva, en el caso de los animales, para realizar ERGs, es casi siempre imprescindible el uso de anestesia general. Se consigue así evitar artefactos producidos por movimientos de los animales, excesiva actividad muscular o estrés (Komaromy *et al.*, 2002). Es importante tener en cuenta el tipo

de anestésico utilizado ya que estos tienen en mayor o menor medida efectos sobre los registros electrofisiológicos (Sloan, 1998).

De entre los anestésicos disponibles para los animales los más utilizados para la realización de ERGs son la ketamina asociada a agonistas α -2 adrenérgicos (Kommonen y Raitta, 1987; Kommonen, 1988). Tiene la ventaja de modificar muy poco la morfología del ERG y de centrar el ojo facilitando así su exposición a los flashes. No obstante esta combinación sería útil para protocolos que no excedan los 40 minutos. Para protocolos de más de 40 minutos es conveniente recurrir a la anestesia con agentes volátiles a pesar de que alteran más el ERG (Kommonen *et al.*, 1988; Yanase y Ogawa, 1996; Sloan, 1988).

3.1.6.1.- AGENTES VOLÁTILES:

Los agentes volátiles más usados en veterinaria son el halotano, el isoflurano y el sevoflurano, este último de incorporación más reciente tiene la ventaja de no irritar apenas las vías respiratorias (Steffey, 1996). La concentración alveolar mínima (CAM) en el perro de estos agentes es $2,09 \pm 0,13$, $1,30 \pm 0,12$ y $0,94 \pm 0,09$ para el sevoflurano, isoflurano y halotano respectivamente. Concentraciones de entre 1 y 1,5 CAM, mantienen la ventilación espontánea en el perro (Mutoh *et al.*, 1997) y en el gato (Hikasa *et al.*, 1997). Los efectos respiratorios del isoflurano y del sevoflurano son similares y mayores que los del halotano. La calidad de la anestesia es buena con los tres agentes. El sevoflurano proporciona tiempos de recuperación más cortos que el halotano y similares a los del isoflurano (Mutoh *et al.*, 1997).

Todos los anestésicos inhalatorios provocan hipotensión sistémica por disminución de la resistencia vascular periférica (Steffey, 1996). Este efecto es similar entre el isoflurano y el sevoflurano y menor con el halotano (Mutoh *et al.*, 1997).

El halotano y el isoflurano en la rata (Antunes *et al.*, 2003a) y en el hombre (Sloan, 1998) disminuyen sensiblemente las amplitudes del EEG y de los potenciales evocados auditivos. Para algunos autores los halogenados disminuyen sensiblemente la PIO en el hombre (Mirakhur *et al.*, 1990). Para otros, tienen un mínimo efecto sobre la PIO, tanto en el hombre (Watcha *et al.*, 1990) como en el perro (Almeida *et al.*, 2004).

En un trabajo reciente se vio que los tiempos angiográficos del perro no varían con el uso de isoflurano, halotano o sevoflurano, con lo que estos anestésicos no alteran de forma significativa la hemodinámica de la retina. Además el uso de cualquiera de estos tres anestésicos, es seguro y favorece una recuperación rápida (Martin *et al.*, 2001).

3.1.6.1.1.- EFECTOS SOBRE EL ERG:

Los halogenados no tienen efectos sobre el ERG para algunos autores (Wongpichedchai *et al.*, 1992), mientras que para otros el halotano en el hombre disminuye la amplitud de la *onda b* del ERG sin modificar su latencia, debido a cambios metabólicos en la retina (Raitta *et al.*, 1979). Tremblay y Parkinson observaron efectos sobre el ERG de niños relacionados con el halotano y el isoflurano. Dichos efectos fueron más evidentes en condiciones escotópicas, disminuyendo un poco la amplitud de la *onda a* y bastante la de la *onda b*. En los ERGs fotópicos se producía un retraso y disminución de la fase OFF de las respuestas (Tremblay y Parkinson, 2003). En este trabajo el halotano se combinó con óxido nítrico, el cual se sabe que disminuye la amplitud de ciertos potenciales evocados corticales (Dzolic *et al.*, 1996).

No hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio específico sobre los efectos en el ERG del perro del isoflurano pero si existen de otros halogenados. Así Yanase *et al.*, estudiaron los efectos del halotano y del sevoflurano sobre el electroretinograma del perro. Su estudio se limitó a observar los efectos sobre el ERG en condiciones escotópicas estudiando la *onda b*, los OPs y el STR. Concluyeron que ambos anestésicos disminuyen drásticamente el STR, ligeramente la *onda b* mientras que los OPs aumentan con estos anestésicos. En este estudio los ERGs obtenidos con halotano y sevoflurano fueron básicamente iguales (Yanase y Ogawa, 1996). En el mono y en el hombre los anestésicos halogenados alteran el ERG retrasando la adaptación a la oscuridad de los conos (Norren y Padnos, 1975). Dicho retraso no se produce con el uso de ketamina o de barbitúricos (Norren y Padnos, 1977).

3.1.6.1.2.- MECANISMO DE ACCIÓN:

El mecanismo mediante el cual los anestésicos halogenados alteran el ERG no se conoce con exactitud. Se ha sugerido que alteran la distribución de neurotransmisores como el glutamato, el GABA o la dopamina en el sistema nervioso. Así según Schlame y Hemmings, los anestésicos volátiles inhiben la liberación de glutamato por parte de las vesículas sinápticas (Schlame y Hemmings, 1995). Cheng y Brunner señalaron que los anestésicos volátiles inhiben la degradación metabólica del GABA haciendo que se acumule en ciertas áreas del sistema nervioso de ratas (Cheng y Brunner, 1981). También se observó que el transporte de dopamina en el cerebro se inhibe con este tipo de anestésicos (El-Maghrabi y Eckenhoff, 1993). Por otra parte se sabe que la *onda b* del ERG disminuye con la administración de la dopamina en el conejo (Huppe-Gourgues *et al.*, 2005).

Yanase y Ogawa, observaron que los anestésicos volátiles provocan efectos contrarios en dos componentes que según muchos autores tienen un origen similar, el STR y los OPs. Estos autores

sugieren que los OPs y el STR del perro no tienen el mismo origen retiniano al reaccionar de manera opuesta a una misma situación (Yanase y Ogawa, 1996).

Recientemente se relacionó al halotano con cierto grado de protección de la retina ante estímulos luminosos muy intensos (Keller *et al.*, 2001) que causan daños en los FR por apoptosis (Noell *et al.*, 1966). Tales daños solo ocurren en presencia de rodopsina, es decir cuando esta tiene un ritmo de regeneración tras blanqueamiento rápido (Grimm *et al.*, 2001) en parte por fosforilación de la misma (Ablonczy *et al.*, 2005). En un interesante estudio realizado en ratas, el halotano inhibió de manera reversible la regeneración metabólica de la rodopsina, evitando así la absorción de gran número de fotones durante la exposición a la luz. En consecuencia las retinas de pacientes anestesiados con halotano estarían protegidas frente a la degeneración inducida por la luz. Curiosamente dicha protección solo es efectiva frente a la luz blanca intensa y no frente a la luz azul intensa (Keller *et al.*, 2001). Esto ocurre porque la luz azul es capaz de estimular metabolitos intermedios de la rodopsina, y conseguir el mismo efecto que se consigue al estimular directamente la rodopsina, es decir pueden completar la fototransducción a partir de esos metabolitos más tardíos (metadorropsina II). Este proceso se llama fotoinversión; la capacidad que la luz azul tiene para reconvertir esos metabolitos tardíos (metadorropsina II) otra vez en rodopsina y recomenzar la fototransducción. Así inicialmente la luz azul causa el blanqueamiento de la rodopsina pero no se ve tan influenciada por su regeneración ya que sigue actuando sobre sus metabolitos reconvirtiéndolos en rodopsina (Grimm *et al.*, 2000). Por lo tanto la luz azul intensa es potencialmente más dañina para la retina que la blanca (Grimm *et al.*, 2001).

Este efecto inhibitor del halotano no se encontró con otros anestésicos como la ketamina o la xilacina en ratas, y los autores no descartan que efectos similares se produzcan con otros anestésicos volátiles. El mecanismo exacto mediante el cual el halotano inhibe la regeneración de rodopsina se desconoce, aunque podría tratarse de competencia con el retinal (Keller *et al.*, 2001). En efecto, los anestésicos volátiles y en particular el halotano compiten con el retinal y de manera general con ligandos endógenos de proteínas G (Ishizawa *et al.*, 2002).

3.1.6.2.- PROPOFOL:

Los anestésicos inhalatorios se combinan con anestésicos inyectables, para realizar la intubación orotraqueal. El propofol es uno de los más utilizados y su uso para la intubación y posterior mantenimiento con anestésicos volátiles no afecta a los tiempos de recuperación de la anestesia (Weaver y Raptopoulos, 1990). En el perro provoca hipotensión transitoria tras su inyección intravenosa, tiene una farmacocinética rápida y sus efectos cardiovasculares desaparecen a los pocos minutos de su administración (Nakaigawa *et al.*, 1995). El propofol tiene muchos menos

efectos sobre los potenciales corticales y subcorticales que los anestésicos inhalatorios en la rata (Sloan, 1998; Antunes *et al.*, 2003a; 2003b) y en el perro (Bergamasco *et al.*, 2003). Su uso en el perro no modifica la PIO (Batista *et al.*, 2003).

3.1.6.3.- BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES:

En los animales para realizar registros electrorretinográficos es interesante el uso de bloqueantes neuromusculares no despolarizantes. Estos tienen la ventaja de centrar el ojo exponiéndolo adecuadamente a los flashes y de eliminar la actividad muscular que puede ser fuente de ruido (Komaromy *et al.*, 2002). Un ejemplo es el atracurio, utilizado en muchos protocolos anestésicos para el registro de ERGs. Está demostrado que los efectos del atracurio así como los del vecuronio en el bloqueo neuromuscular están potenciados cuando se usan con anestésicos inhalatorios con respecto a su uso con anestésicos inyectables (Kastrup *et al.*, 2005; Nagahama *et al.*, 2006). Su duración es intermedia comparándola con la de otros bloqueantes, y depende del anestésico con el que esté asociado, con anestésicos halogenados dura de 20 a 35 minutos y con anestésicos inyectables, como el propofol de 10 a 15 minutos (Kastrup *et al.*, 2005). El atracurio no modifica la PIO y la presión arterial en el perro cuando se usa con isoflurano (Mc Murphy *et al.*, 2004) o con sevoflurano (Kastrup *et al.*, 2005). No hay ningún estudio que relacione los efectos que el atracurio tiene sobre el ERG en particular, pero se sabe que en general los relajantes o bloqueantes musculares no tienen efectos ni sobre el EEG ni sobre los potenciales evocados sensoriales (Sloan, 1988).

3.1.7.- PRESIÓN SANGUÍNEA DE GASES:

La influencia de las presiones parciales de oxígeno y de dióxido de carbono en sangre arterial sobre el ERG ha sido motivo de muchos estudios (Niemeyer *et al.*, 1982; Niemeyer y Steinberg 1982; Linsenmeier *et al.*, 1983; Derwent y Linsenmeier, 2000). La mayoría de los anestésicos y en particular los volátiles deprimen el centro respiratorio de manera dosis dependiente. Esta depresión da lugar a situaciones de hipoventilación que se ponen de manifiesto con hipoxia e hipercapnia (Steffey, 1996). Con concentraciones de hasta 1,5 CAM de halotano, isoflurano o sevoflurano los perros mantienen la ventilación de manera espontánea. Cuando se sobrepasan esas concentraciones, hecho frecuente en algunos protocolos anestésicos con poca o ninguna premedicación, la depresión respiratoria es muy severa (Mutoh *et al.*, 1997). En situaciones de hipercapnia sostenida durante el tiempo anestésico, se prolonga el tiempo de recuperación anestésica debido a los efectos narcotizantes del CO₂ a altas concentraciones (Mc Donell, 1996).

3.1.7.1- PRESIÓN ARTERIAL DE OXÍGENO (Pa O₂):

Existen dos maneras de conocer la presión arterial de O₂, una de ellas y probablemente la más fiable, es midiéndola directamente en una muestra de sangre arterial con un gasómetro y otra manera aproximada es aplicando la fórmula siguiente: $PaO_2 = F_i O_2 \times 5$, en donde F_i es la fracción inspiratoria de oxígeno que cuando lo que respira el animal es aire ambiente está entorno a 20 mmHg. Esta fórmula solo se puede aplicar a animales sanos, cuyo coeficiente ventilación/perfusión sea correcto (Mc Donell, 1996).

En un trabajo realizado en gatos se valoró la influencia de la hipercapnia y de la hipoxia sobre la *onda c*, el LP y la *onda b*. En este estudio se observó que tanto la *onda c* como el LP (directamente relacionados con el EPR) se mostraban alterados cuando la PaO₂ descendía por debajo de 80 mmHg, mientras que la *onda b* no mostraba cambios a menos que la PaO₂ descendiera de 40 mmHg. La estabilidad de la *onda b* frente a hipoxias moderadas, se mantiene en el tiempo es decir no depende de la duración del episodio hipoxémico. Por lo tanto, según los autores, el EPR es mucho más sensible a la hipoxia que las células de la neurorretina (Linsenmeier *et al.*, 1983).

Otro estudio similar a este valoró los efectos de la hipoxia, hiperoxia e hipercapnia sobre la *onda b* y la *c* del ERG del gato. Sobre la *onda b* la hiperoxia severa (media de PaO₂ 395 mmHg) o moderada (media de PaO₂ 248 mmHg) no tiene efectos apreciables. La hipoxia severa (PaO₂ = 20-30 mmHg) produjo una significativa pérdida de amplitud de la *onda b*. En esa situación de hipoxia, la *onda b* recuperó su amplitud cuando se reestableció la ventilación con aire ambiente. Sobre la *onda c* la hiperoxia produjo una moderada depresión, mientras que la hipoxia provocó un comportamiento bifásico, aumentó significativamente mientras duró la hipoxia y a continuación su amplitud disminuyó por debajo de los valores basales hasta finalmente recuperarse (Niemeyer *et al.*, 1982).

Los vasos retinianos tanto en el hombre como en los animales responden a la hiperoxia y a la hipoxia con vasoconstricción y vasodilatación respectivamente (Frayser y Hickam 1964). Dicha autorregulación tiene un límite funcional que se encuentra entorno a 40 mmHg, es decir no es suficiente para mantener la amplitud de la *onda b* a PaO₂ inferiores (Linsenmeier *et al.*, 1983). La hiperoxia prolongada (varios días) provoca alteraciones anatómicas y funcionales en la retina de los neonatos (Dembinska *et al.*, 2001).

La vasodilatación en respuesta a la hipoxia tiene relación con la liberación de óxido nítrico por parte del endotelio de los vasos (Nagaoaka *et al.*, 2002). Una PaO₂ de entre 375 y 475 mmHg podría aumentar la presión de O₂ preretinal por difusión hacia la coroides, no obstante la

vasoconstricción que esa PaO_2 provoca, lo evita, de ahí que la *onda b* se mantenga inalterada durante la hiperoxia (Niemeyer *et al.*, 1982).

El EPR se encuentra próximo a la red coriocapilar, por lo tanto cambios en el flujo sanguíneo de la coroides influyen en la amplitud de la *onda c*, sin embargo, la *onda b* generada por células de la retina media se nutre de vasos retinianos (Samuelson, 1999) que tienen una gran capacidad autorreguladora frente a situaciones de hipoxia e hiperoxia (Niemeyer *et al.*, 1982). Sin embargo, células de la retina externa o el EPR dependen de la circulación coroidal la cual tiene mucha menor capacidad de autorregulación (Delaey y Van de Voorde, 2000; Demant *et al.*, 1982).

Otro trabajo más reciente estudió los efectos de la hipoxia sobre la *onda b*, pero también sobre la *onda a*. Observaron que los FR realizan la fototransducción correctamente en condiciones de hipoxia. En situaciones de hipoxia el metabolismo oxidativo de los FR disminuye y los componentes lentos del ERG (PIII lento, *onda b*) que dependen de ellos varían, mientras la *onda a* apenas se modifica. Al disminuir el metabolismo oxidativo por la hipoxia, aumenta la glucólisis para mantener la producción de energía y mantener una buena tasa de ATP. Dicha glucólisis contribuye a acidificar más el entorno de los FR (Derwent y Linsenmeier, 2000). Este mecanismo compensatorio sería lo que explica que la *onda a* no varíe mientras que sí lo hacen los componentes lentos del ERG. Se trata de un efecto causado por la acidosis y no por la hipoxia, al igual que ocurre con la acidosis provocada por la hipercapnia (Niemeyer *et al.*, 1982). Por otra parte, los cambios producidos en la concentración de K^+ en hipoxia, responsables de los cambios en los componentes lentos del ERG, no son debidos a un enlentecimiento en la bomba de Na^+/K^+ por falta de ATP, como postulan algunos autores (Linsenmeier y Steinberg, 1984b) sino a una redistribución iónica debido al aumento de H^+ por la acidosis (Derwent y Linsenmeier, 2000).

3.1.7.2.- PRESIÓN ARTERIAL DE DIÓXIDO DE CARBONO (PaCO_2):

Al igual que ocurría con la PaO_2 , la PaCO_2 también se puede determinar de varias maneras; tomando sangre arterial y midiéndola con un gasómetro o extrapolándola de la fracción espiratoria final de CO_2 (FEFCO_2), en este caso los valores obtenidos son un poco menores de los valores de PaCO_2 real (de 3 a 5 mmHg menos). Es importante señalar en este punto que los efectos de la hipercapnia sobre la presión arterial media son en un primer momento hipotensión por disminución de la resistencia vascular periférica y a continuación recuperación de la PAM por vasoconstricción mediada por un reflejo simpático (Mc Donell, 1996). Sobre la PIO se sabe que aumenta en situaciones de hipercapnia en el hombre (Petounis *et al.*, 1980).

Los efectos de la hipercapnia sobre el ERG se han estudiado mucho en el gato. PaCO_2 de entre 50 y 60 mmHg producen un descenso en la amplitud de la *onda b* proporcional a la hipercapnia. La

onda c sufre alteraciones bifásicas en hipercapnia, similares a las que provoca la hipoxia. El pH desciende de manera proporcional a la hipercapnia, así con PaCO_2 de 60 mmHg el pH baja a 7,08, al contrario que durante la hipoxia y la hiperoxia en donde no se modifica (Niemeyer *et al.*, 1982).

Los vasos retinianos se dilatan frente a la hipercapnia al igual que lo hacen en respuesta a la hipoxia. En ambos casos parece tener relación con el óxido nítrico (Nagaoka *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003). En efecto, en el caso de la hipercapnia (acidosis respiratoria), se estimula la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico puede ser sintetizado por ciertas neuronas o por el endotelio vascular, las neuronas lo secretan más a pH bajo y las células endoteliales mejor a pH alcalino en el encéfalo (Sato *et al.*, 2003). En la retina de los mamíferos se encontró óxido nítrico en los FR, en las células amacrinas, en las de Müller, en las horizontales y en las ganglionares (Venturini *et al.*, 1991).

El efecto vasodilatador del CO_2 en la retina debería hacer aumentar la *onda b* pero según Niemeyer *et al.*, los efectos del bajo pH son más potentes en este caso y hacen caer la amplitud de la *onda b* (Niemeyer *et al.*, 1982). En efecto, un estudio *in vitro* demostró que la amplitud de la *onda b* también se reduce al acidificar el pH de la retina con HCl (Niemeyer y Steinberg, 1981).

Según Linsenmeier *et al.*, las alteraciones causadas por la hipercapnia (acidosis respiratoria) ocurren de manera más temprana en el EPR que en la neurorretina, así los efectos sobre la *onda b* aparecen con $\text{pH} \leq 7,2$, mientras que sobre el EPR lo hace a $\text{pH} \leq 7,3$ (Linsenmeier *et al.*, 1983). Sin embargo, Hiroi *et al.* creen que el EPR es más resistente a la acidosis que la neurorretina y en particular que las células de Müller. Un estudio que valoró los efectos de la hipercapnia utilizando microelectrodos intrarretinales sensibles al K^+ , mostró que la reducción de K^+ en respuesta a la luz también se ve alterada por la hipercapnia. La *onda b* se vio reducida en amplitud sin afectarse su latencia y el potencial de reposo sufrió variaciones independientes del pH. Según los autores, el aumento del CO_2 causa un aumento de ácido carbónico y de H^+ que afecta al potencial de reposo al causar la despolarización de la membrana apical del EPR. El efecto sobre la *onda b* se debería a un efecto de la acidosis sobre las células de Müller (Hiroi *et al.*, 1994).

Se cree que la hipoxia y la hipercapnia actúan a través de mecanismos celulares similares ya que provocan cambios en la *onda b* y en la *onda c* parecidos (Linsenmeier *et al.*, 1983). Al igual que la hipercapnia, la hipoxia también puede disminuir el pH en el EPR por alteración del metabolismo de los FR que en condiciones hipóxicas utilizan más la glucólisis anaerobia. No obstante probablemente no sean mecanismos totalmente idénticos ya que su influencia sobre la morfología del LP es distinta (Derwent y Linsenmeier, 2000). En cuanto a la acidosis, sus efectos son más acusados y rápidos cuando se trata de acidosis metabólica que cuando es respiratoria. En hipoxia la glucólisis anaerobia provoca acidosis intra y extracelular, mientras que las concentraciones altas de

CO₂ provocan efectos más rápidos sobre el pH intracelular que sobre el extracelular (Hiroi *et al.*, 1994).

3.1.8.- PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (PAM):

El hecho de que la *onda b* no se altere por cambios en el flujo vascular retiniano se ha observado en el hombre (Riva *et al.*, 1981) y en otros mamíferos (Demant *et al.*, 1982; Delaey y Van De Voorde, 2000). La función retiniana depende en gran medida de la presión de O₂ tisular, por lo tanto ante oxigenación constante del paciente, dicha PO₂ depende del flujo de los vasos retinianos. Conviene recordar en este punto que en los animales existen varias maneras de medir la presión arterial. La más fiable es la medición invasiva, cateterizando directamente una arteria y conectándola a un aparato equipado con un transductor de presiones. Los métodos oscilométricos son los más inexactos. Por último, está el doppler, con el inconveniente de que solo se puede medir de manera fiable la presión arterial sistólica (Haskins, 1996).

En el gato ha sido estudiado con detalle el efecto que provocan modificaciones drásticas de la PAM sobre las *ondas b* y *c* del ERG, las cuales dependen de la vascularización retiniana y coroidal respectivamente. La *onda b* permanece estable ante un gran rango de variaciones de PAM. Lo cual demuestra una vez más la gran capacidad de autorregulación de los vasos retinianos. El límite bajo de autorregulación en este experimento fue de 55 mmHg, el límite alto no fue alcanzado a pesar de que la máxima PAM llegó hasta 255 mmHg (Demant *et al.*, 1982). Ese límite bajo de autorregulación vascular retiniana coincide con el límite de autorregulación vascular cerebral del hombre y del perro que se sitúa sobre 50 mmHg (Lassen, 1959). En el hombre se observó que la capacidad autorreguladora de sus vasos retinianos, particularmente de los capilares de la mácula, es capaz de compensar caídas de la presión de perfusión ocular (provocada experimentalmente por una PIO de 30 mmHg) de hasta un 36 % (Riva *et al.*, 1981).

En cuanto a la *onda c* relacionada con el EPR, varía su amplitud en dirección opuesta a los cambios de PAM. Esto es debido a la menor capacidad de autorregulación de los vasos de la coroides. La *onda c* tiene un componente que se genera en el EPR (PI) y otro que se genera en la retina (PIII), los cambios en su amplitud provienen de PI, ya que PIII se genera en la neuroretina, la cual se nutre de vasos retinianos cuya capacidad de autorregulación es buena (Riva *et al.*, 1981; Demant *et al.*, 1982; Delaey y Van de Voorde, 2000).

3.2.- FACTORES NO CONTROLABLES:

3.2.1.- DIFERENCIAS ANATÓMICAS:

El conocimiento de la anatomía y de la fisiología específica de la especie estudiada es importante para establecer un protocolo de exploración y su interpretación. Las capacidades de absorción espectral y la densidad de los diferentes tipos de FR en la retina son variables. En efecto, el protocolo de ERG para una rata será distinto del de un mono ya que estos son animales esencialmente diurnos y las ratas son animales esencialmente nocturnos teniendo distinto ratio conos/bastones (Rosolen *et al.*, 2005d). Por otra parte, la presencia o no de TL puede influir en el ERG (Rosolen *et al.*, 2005a; 2005b). En el perro al igual que en el hombre, existen variaciones en el ERG intra e interindividuales (Rosolen *et al.*, 1999; Grover *et al.*, 2003). Este hecho se puede contrarrestar en los estudios experimentales utilizando un tamaño de muestra adecuado (Montiani-Ferreira *et al.*, 2004).

3.2.2.- FACTORES INDIVIDUALES:

El estado de salud y la condición del animal es importante, ya que la presencia de ciertas enfermedades sistémicas, el estrés o el celo con sus cambios neurohormonales tienen repercusiones importantes sobre el funcionamiento retiniano. La presencia de opacidades oculares alterará la iluminación retiniana y por lo tanto también el ERG. Obviamente la mayoría de las enfermedades retinianas afectan al ERG (Narfström y Ekestén, 1999) y son precisamente las que interesa distinguir del resto (Lazard *et al.*, 2000; Mora y Aregall, 2005).

3.2.3.- EDAD:

La edad influye sobre los trazados del ERG. La mayoría de los animales poseen al nacimiento un sistema visual inmaduro (Samuelson, 1999). En el hombre la mayoría de las diferenciaciones nerviosas y conexiones sinápticas de la retina tienen lugar en el útero (Breton *et al.*, 1995). En la primera semana de vida del perro, en la que los ojos todavía están cerrados no hay ERGs registrables, pero en la segunda se detecta una pequeña onda negativa de apenas 5 μ V. A las tres semanas de vida empiezan a aparecer ERGs con su morfología típica cuya amplitud aumenta hasta la cuarta semana. A las 8 semanas las amplitudes del ERG se asemejan ya a las de un adulto. En este desarrollo en las primeras semanas de vida, las variaciones de latencia aparecen de forma más marcada en las ondas *b* y *c* y menos en la *a*. La frecuencia de fusión del flicker que se sitúa cercana a los 70 Hz en el adulto (Miller y Murphy, 1995), también varía con la edad. Así en cachorros de

menos de 3 semanas la curva de fusión del flicker solo presenta la rama de los conos. A las 8 semanas la curva presenta además la de los bastones y se asemeja a la de un adulto. Estos resultados se correlacionan con el desarrollo histológico de la retina en esas primeras semanas de vida. A partir de las 8 semanas se mantiene el ERG y va disminuyendo muy lentamente al ritmo que lo hacen el número de FR y células del EPR (Gum *et al.*, 1984). La retina del gato alcanza su madurez morfológica entorno a los 5 meses (Vogel, 1978). En el caso del cochinillo de indias (*Carvia Porcellus*) que al igual que el hombre nace con los ojos abiertos, el desarrollo de las respuestas visibles en el ERG son muy similares a las de este último (Breton *et al.*, 1995; Armitage, 2001), apuntando a esa especie como un buen modelo animal para ensayos clínicos (Racine *et al.*, 2005).

En cualquier caso es interesante establecer en la medida de lo posible normas propias a cada laboratorio considerando las especies estudiadas, la raza y el rango de edad. Aunque generalmente este fin está condicionado por la casuística de cada clínico y no siempre es posible (Lazard *et al.*, 2000).

3.2.4.- FACTORES ENDÓGENOS:

Existen factores endógenos como los niveles de glucosa que afectan al ERG. Rosolen *et al.*, observaron una importante reducción en la amplitud del flicker de 30 Hz en monos tras administrar glucosa por vía endovenosa (Rosolen *et al.*, 2005c). Se han observado alteraciones en el ERG ante cambios en los niveles de glucosa en sangre en el gato, en donde los bastones se ven más afectados por la glucemia que los conos (Macaluso *et al.*, 1992). En el hombre se observan reducciones en la amplitud de la *onda b* con niveles bajos de glucosa y reducciones en la latencia del flicker con niveles altos (Dawson *et al.*, 2000). Cuando se trabaja con animales hay que prestar especial atención a la influencia que el estrés y el celo, en el caso de las hembras, pueden tener sobre los niveles sanguíneos de glucosa, conviene tenerlo en cuenta a la hora de interpretar los ERGs (Lazard *et al.*, 2000).

3.2.5.- PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO):

La PIO tiene gran influencia en la funcionalidad retiniana. En efecto, una PIO elevada sostenida en el tiempo provoca daños en las células ganglionares (Mittag *et al.*, 2000). De ahí que en electrofisiología la prueba más sensible para detectar los daños causados por una PIO elevada en el hombre (Holder, 2001; Parisi *et al.*, 2006; Atila *et al.*, 2006) y en el perro (Hamor *et al.*, 2000) sea el PERG. No obstante estudios recientes relacionan la PhNR del ERG de pleno campo

convencional con la actividad de las células ganglionares en monos y humanos. Varios estudios demuestran que tras inducir glaucoma la PhNR disminuye, por lo que podría ser una herramienta útil a la hora de valorar los daños producidos por el glaucoma (Viswanathan y Frishman, 1997; Viswanathan *et al.*, 1999; Frishman *et al.*, 2002).

Estudios realizados en el conejo demuestran que incrementos agudos de la PIO no afectan al ERG de pleno campo, a menos que tales incrementos superen los 60 mmHg (Feghali *et al.*, 1991). Así mismo, si la elevación de la PIO dura poco tiempo no afecta a la vasodilatación retiniana en respuesta al flicker ni al propio flicker, indicando que los mecanismos de autorregulación vascular siguen funcionando en esas condiciones en el hombre (Garhofer *et al.*, 2005).

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTORRETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

MATERIAL Y MÉTODOS

IV.-MATERIAL Y MÉTODOS.-

1.- MATERIAL:

1.1.- ANIMALES:

En este trabajo se han utilizado 6 perros de raza Beagle, procedentes del servicio de animales de experimentación de la universidad de Córdoba, todas hembras, ovariectomizadas 3 meses antes del inicio del experimento, con una edad de 18 ± 3 meses y un peso de 16 ± 2 kg. Los animales fueron privados de comida durante las 12 horas previas a cada sesión experimental, pero tuvieron libre acceso al agua en todo momento. El experimento se realizó en las instalaciones del hospital clínico veterinario Rof Codina y se prolongó durante un periodo de dos meses. Todos los animales estaban clínicamente sanos lo cual se determinó de manera periódica a lo largo de esos dos meses mediante exploración física y analítica de rutina. La normalidad oftalmológica se determinó mediante una exploración completa incluyendo examen de fondo de ojo mediante cámara de retinografía 72 horas antes de iniciar los registros de ERGs (**figura 61**).

Los animales se alojaron en el animalario del HCV Rof Codina cumpliendo con todos los requisitos autonómicos, nacionales y de la Unión Europea relativos a la experimentación animal.



1.2.- MATERIAL DE ANESTESIA:

1.2.1.- EQUIPAMIENTO ANESTÉSICO:

- Tubos endotraqueales con balón y manguito, con un diámetro interno de 7, 7.5 y 8 milímetros (Sheridan®, Kendall Company, MA, USA).

- Oxígeno medicinal (Praxair® SL, Madrid).
- Circuito de anestesia circular (Excel 210 SE; Ohmeda-BOC Group, Madison, WI, USA) con vaporizador de isoflurano (Isotec 3, Ohmeda-BOC) y de sevoflurano (Sevotec 3, Ohmeda-BOC).

1.2.2.- FÁRMACOS ANESTÉSICOS:

- Isoflurano (Forane® Abbott Laboratorios, Madrid).
- Sevoflurano (Sevorane® Abbott Laboratorios. Madrid).
- Propofol (Diprivan®; 10mg/ml, ICI-Farma SA. Pontevedra).

1.2.3.- OTROS FÁRMACOS:

- Besilato de atracurio (Traquium®, 5 mg/ml, Abbott Laboratorios SA, Barcelona).
- Tropicamida (Tropicamida®, 10mg/ml, AlconCusi, Barcelona).
- Colirio humectante (Colircusi Humectante®, Alconcusi, Barcelona).

1.2.4.- MATERIAL DE MONITORIZACIÓN:

1.2.4.1.- MONITORIZACIÓN RESPIRATORIA Y DE GASES:

- Monitor respiratorio y de gases (Dräger PM 8050-Medizintechnik GMBH-D-2342, Lübeck, Germany).

1.2.4.2.- MONITORIZACIÓN CARDIOVASCULAR Y TERMOMETRÍA:

- Monitor de signos vitales (Dinamap™ Plus Monitor de Signos Vitales; Critikon Inc., Tampa, FL, USA).

1.3.- MATERIAL AUXILIAR:

- Catéteres intravenosos radiopacos apirógenos de 20 y 22 gauges (Vialon® Material, Becton Dickinson, Madrid).
- Solución de ringer lactato (Ringer Lactato, B/Braun Medical SA, Barcelona).
- Jeringas de 1 ml y de 10 ml (Discardit™ II, Becton Dickinson, Madrid).
- Sistemas de infusión por gravedad (Perfusend®, Sendal, Cáceres).
- Regulador de flujo (Easyflow®, Cardiomedical del Mediterráneo, Murcia)).
- Alargadera con llave de tres vías (Discofix® C-3, B/Braun Medical SA, Barcelona).
- Alcohol (Alcohol sanitario 96%, Laboratorio Noriega SL, Asturias).
- Esparadrapo de tejido (Galeno, Martínez Llenas SA, Barcelona).
- Gasas de algodón 100 x 100 (Texpol®, Textilplanas Oliveras, Manresa).
- Aguja hipodérmica de 20 gauges (Microlance™ 3, Becton Dickinson, Madrid).
- Mini-cámara inalámbrica (Receiver LYD®-203c, Heymelot SL, Barcelona).
- Monitor de televisión a color de 14 pulgadas (Philips®, San Luis SL, Lugo).
- Luxómetro (Digital Lux tester TES-1334, Barcelona).
- Dispositivo posicionador y de contención cefálica (manufactura propia).

1.4.- MATERIAL DE ESTIMULACIÓN Y DE REGISTRO:

Hemos utilizado un electroretinógrafo de la marca Visiosystem (Siem Bio-Médicale, Nîmes, France). Consta de una unidad estimuladora, de un amplificador y de una unidad de recogida y procesado de datos.

1.4.1.-FOTOESTIMULADORES:

Fotoestimulador binocular, con dos flashes de xenon independientes. La luz emitida por los fotoestimuladores consiste en flashes blancos de 2,5 ms de duración y 6,5 cd/m².s (0,81 log cd.s.m⁻²) de luminancia. La superficie estimulante de cada flash posee una superficie difusora de color blanco que mide 2,5 cm de diámetro. Consta de dos ranuras en cada vía para la interposición de filtros (**figura 62**). Se han utilizado dos tipos de filtros:

1. Filtros atenuadores de gelatina de densidad neutra (ND Kodak Wratten 96®, Eastman Kodak Company, NY, USA) con distinto poder de atenuación: ND0.3, ND0.4, ND0.9, ND1 y ND2.
2. Filtros azules de gelatina con luz centrada en 440 nm (Kodak Wratten 98®, Eastman Kodak Company, NY, USA) con un poder de atenuación equivalente al de los filtros ND1.

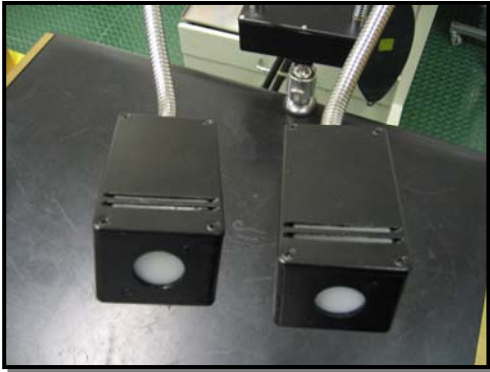


Figura 62: Fotoestimulador de tipo binocular, con ranuras para la interposición de filtros.

1.4.2.- AMPLIFICADOR:

Las características del amplificador son:

- 4 vías (2 para PEV y 2 para ERG).
- Sensibilidad: 0,1 μ V.
- Ganancia: amplificación 100 000 veces a 100% y 10 000 a 10%.
- Filtro electrónico: ancho de banda 0,1-300Hz con filtro automático que rechaza 50 Hz.
- Aislamiento del paciente mediante optoacopladores y convertidores de tensión.

1.4.3.- UNIDAD DE PROCESADO Y DE RECOGIDA DE DATOS:

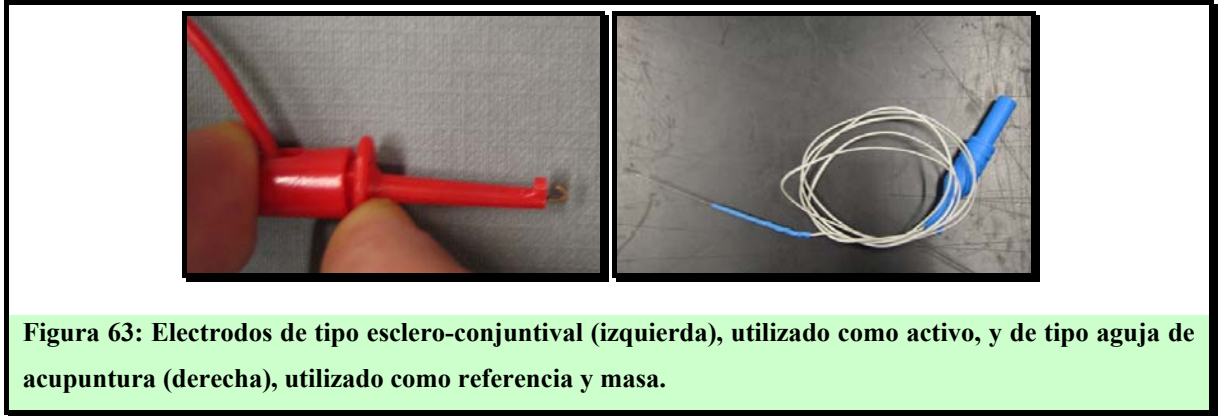
1.4.3.1.- ELECTRODOS:

1.4.3.1.1.- *ACTIVOS*:

- Electrodo activo de tipo esclero-conjuntivales esterilizables (**figura 63**) (Rosolen et al., 1998).

1.4.3.1.2.- REFERENCIA Y MASA:

- Electrodo de referencia y de masa de tipo aguja de acupuntura (**figura 63**).



1.4.3.2.- BASE INFORMÁTICA:

- Ordenador PC (Pentium) con procesador de 700 MHz y sistema operativo Windows 98.
- Monitor SVGA de 17 pulgadas.
- Impresora a color.
- Tarjeta de adquisición interna (desarrollada por SIEM) de 4 vías y sensibilidad de 20 mV.
- Software de recogida y procesado de datos. El programa ofrece la posibilidad de elegir el tipo de examen (ERG o PEV), el número de estímulos, la ventana de registro (hasta 500 ms), el ojo a estimular (uno solo, ambos o ninguno), la ganancia (1-100 %), el filtro de entrada (anchura de banda hasta 300 Hz) y por último la frecuencia de estimulación (desde 0,1 hasta 30 Hz) (**figura 64**).



Figura 64: Ventana de selección de parámetros de estimulación, de recogida, así como de tipo de examen.

Una vez obtenidas las curvas con las características de estimulación seleccionadas en el paso anterior, se pueden medir (colocación automática y/o manual de cursores), dilatar, superponer, etc. Asimismo permite realizar un lisado de las gráficas mediante un filtro numérico que utiliza el análisis de Fourier. En este filtraje numérico podemos seleccionar o cortar las frecuencias que nos interesen evidentemente siempre y cuando se encuentren incluidas en el ancho de banda seleccionado antes de realizar el registro (**figura 65**).

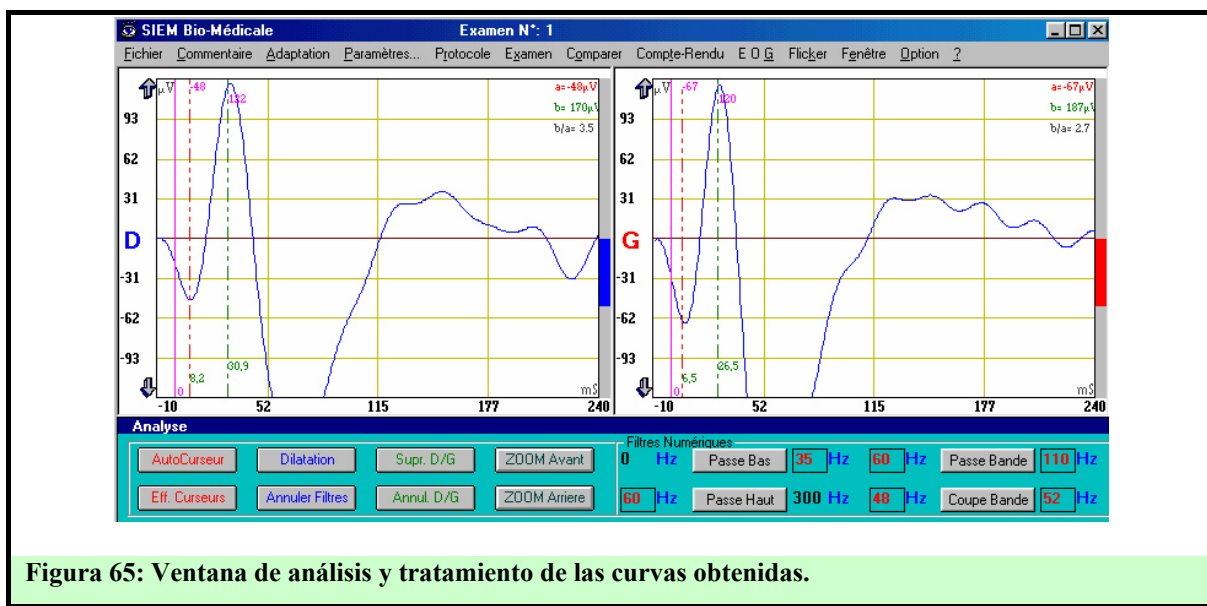


Figura 65: Ventana de análisis y tratamiento de las curvas obtenidas.

2.- MÉTODOS:

2.1.- GRUPOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL:

El experimento se dividió en cuatro grupos para los cuales se realizaron ERGs bajo distintas condiciones anestésicas, con el fin de estudiar las variaciones de los mismos en función de dos factores, la CAPNIA y el TIPO DE ANESTÉSICO:

1. **Grupo ISON:** anestesia con isoflurano en normocapnia, controlando la ventilación hasta conseguir durante todo el experimento una fracción espiratoria final de CO_2 (FEFCO_2) de 35 ± 3 mmHg.
2. **Grupo ISOH:** anestesia con isoflurano en hipercapnia, controlando la ventilación hasta conseguir durante todo el experimento una fracción espiratoria final de CO_2 (FEFCO_2) de 65 ± 3 mmHg.

3. **Grupo SEVON:** anestesia con sevoflurano en normocapnia, controlando la ventilación hasta conseguir durante todo el experimento una fracción espiratoria final de CO_2 (FEFCO_2) de 35 ± 3 mmHg.
4. **Grupo SEVOH:** anestesia con sevoflurano en hipercapnia, controlando la ventilación hasta conseguir durante todo el experimento una fracción espiratoria final de CO_2 (FEFCO_2) de 65 ± 3 mmHg.

El desarrollo del experimento se llevó a cabo de tal forma que todas las sesiones se realizaron a la misma hora, respetando 12 horas de ayuno de comida y permitiendo el libre acceso al agua. Antes de la realización de cada sesión los perros fueron sometidos a un ambiente fotópico (20 cd/m^2) de al menos 2 horas, recurriendo para ello a una sala de preparación con un ambiente luminoso de luz blanca artificial, el ambiente luminoso se midió a la altura de los ojos mediante un luxómetro. El experimento se realizó en una sala cuyo ambiente fotópico fue de 20 cd/m^2 (medido de igual forma que en la sala de preparación) y en la que fue posible alcanzar un ambiente escotópico completo (0 cd/m^2).

Una hora antes de iniciar el experimento se procedió a instilar una gota de tropicamida en cada ojo cada 10 minutos hasta lograr una midriasis completa, la cual fue medida antes y después del desarrollo del experimento siempre por la misma persona para minimizar al máximo el error de medición.

Los animales permanecieron durante todo el experimento anestesiados, en decúbito esternal con los miembros anteriores hacia la parte caudal y la cabeza elevada para conseguir una línea de visión teórica lo más próxima posible a 180 grados, esto se logró colocando una toalla en forma de cuña bajo el maxilar inferior y un dispositivo posicionador y de contención cefálica (**figura 66**). A lo largo del experimento se mantuvo la hidratación de la córnea mediante un gel oftalmológico de baja viscosidad.

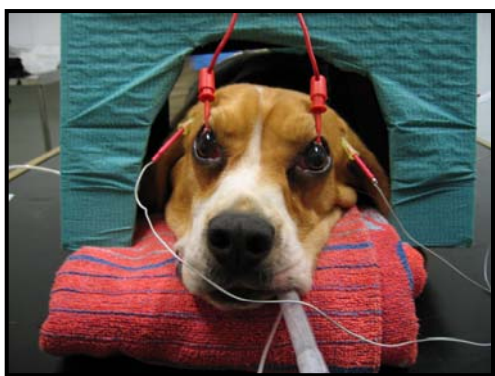


Figura 66: Posición de los electrodos activos y de referencia, así como de la cabeza del animal previo al inicio del examen electrorretinográfico.

2.2.- PROTOCOLO ANESTÉSICO:

2.2.1.- DESARROLLO:

Los perros fueron sometidos a ayuno de comida las 12 horas previas a cada sesión, pudiendo ingerir agua hasta las 2 horas previas en que fueron introducidos en una dependencia con ambiente fotópico, estando en ese tiempo en un ambiente tranquilo con temperatura controlada (20-22 °C).

Una vez transcurrido el tiempo de adaptación al ambiente fotópico y lograda la midriasis los perros fueron conducidos a un quirófano habilitado para la realización de exploraciones electrorretinográficas. En este lugar se procedió a la canalización de una vía venosa en la vena cefálica con un catéter de 20 gauges el cual fue fijado a la pata con esparadrapo hipoalergénico de tejido, y conectado a un sistema de infusión por gravedad, a un regulador de flujo y a una llave de tres vías, el líquido a infundir fue siempre una solución de ringer lactato a un ritmo de goteo de 10 ml/kg/hora. Para la inducción de la anestesia se usó propofol lipuro en bolus de 4 mg/kg hasta que se permitió la intubación, ésta se realizó con un tubo endotraqueal de diámetro adecuado a cada animal oscilando entre el nº 7 y el nº 9, se realizó el neumotaponamiento con una jeringa de 10 ml comprobando la presión de llenado. Se conectó el sensor del capnógrafo al tubo endotraqueal y el conjunto a un circuito circular con un flujo de 1.5 l/minuto de O₂. Se reguló el vaporizador del gas anestésico en 5% con isoflurano u 8% si se trataba de sevoflurano, hasta que se inhibió el reflejo palpebral bajando luego la saturación de gas anestésico hasta lograr una fracción espiratoria de 1.4 CAM. A continuación se administró IV besilato de atracurio a una dosis inicial de 0,5 mg/kg para centrar el ojo y bloquear los músculos respiratorios con el fin de poder controlar la ventilación y ajustar la FEFCO₂ para cada grupo. Se repitió la inyección de atracurio a los 20-30 minutos, a una dosis de 0,25 mg/kg. Una vez hecho esto, se midió el diámetro de la pupila, se hidrató la córnea, se colocaron los electrodos y los fotoestimuladores como se indica más abajo y se procedió al inicio del protocolo electrorretinográfico descrito anteriormente. Cuando terminó el protocolo electrorretiniográfico, se retiraron los electrodos y los fotoestimuladores, se volvió a medir el diámetro pupilar y se puso el vaporizador a cero, dejando que los animales se recuperaran respirando oxígeno.

2.2.2.- MEDICIONES:

Para la monitorización de la presión arterial media (PAM) se dispuso de un monitor de signos vitales con una serie de manguitos que se adaptaron al tamaño del perro, y que se colocaron en el miembro posterior en la proyección de la arteria metatarsiana dorsal, programando el monitor de presiones para realizar mediciones de forma automática cada 5 minutos. Este mismo monitor sirvió

para medir la frecuencia cardíaca (FC) y la temperatura rectal (T^a) con la ayuda de una sonda termométrica. La $FEFCO_2$, la del gas anestésico, la fracción inspiratoria de O_2 (FiO_2) y la saturación parcial de O_2 (SpO_2) se determinaron mediante un sensor conectado al tubo endotraqueal y a un monitor respiratorio (Dräger PM 8050). Todas estas medidas fueron tomadas en el tiempo cero (basales, antes de la administración de propofol) y cada cinco minutos durante 75 minutos.

En la fase escotópica los monitores fueron tapados para que no emitiesen luz y grabados con una minicámara inalámbrica que emitía a un monitor de televisión situado en una sala anexa; eso nos permitió seguir tomando medidas durante la fase escotópica. Al final del experimento y tras apagar la anestesia se anotó el tiempo de extubación (momento en que el animal no soportó el tubo endotraqueal), el tiempo de posición voluntaria en decúbito esternal y por último el tiempo de deambulación.

2.3.- ESTUDIO ELECTORRETINOGRÁFICO:

2.3.1.- DESARROLLO:

Los fotoestimuladores se colocaron a una distancia no superior a 1,5 cm del ojo y sirvieron para realizar estímulos binoculares de pleno campo (**figura 67**) (Rosolen *et al.*, 2002). Los registros se hicieron todos con ganancia de 4 (amplificado 4000 veces) salvo cuando se registró el single flash (SF) en que se bajó a 2 (amplificado 2000 veces) y en ventanas de registro de 250 ms para todas las medidas salvo para los ERGs flicker en que se realizó en una ventana de 500 ms. La anchura de banda del filtro electrónico de entrada se reguló a 0,1-300 Hz para todos los parámetros medidos. Para el estudio del AERG se realizó un lisado de las respuestas obtenidas ajustando el filtro de paso de banda bajo en 70 Hz (es decir seleccionamos las frecuencias de onda hasta 70 Hz, rechazando las que quedasen por encima). Los OPs se extrajeron del ERG fotópico a la intensidad de estímulo inmediatamente superior a la que produjo el V_{max} (máxima amplitud de la *onda b* en la función luminancia-respuesta). Para su extracción se seleccionó en el lisado posterior al registro, un corte de banda de 100-300 Hz (**figura 73**).



Figura 67: Posición de los fotoestimuladores durante el examen electrorretinográfico.

Los electrodos activos utilizados fueron del tipo esclero-conjuntival esterilizables. A cada uno de los seis animales se le asignó su propio par de electrodos activos. Estos se colocaron a las 12 en la conjuntiva bulbar lo más cerca posible de la córnea, ayudando a mantener los párpados abiertos y la membrana nictitante sin prolapsar (**figuras 66 y 68**).

Los electrodos de referencia y el de tierra utilizados fueron de tipo aguja enfundados en el interior de una aguja hipodérmica estéril diferente para cada electrodo y para cada perro. Los electrodos de referencia y el de tierra se colocaron en posición subcutánea a nivel del canto temporal cerca de la oreja de cada lado y en la región interescapular respectivamente (**figura 68**).

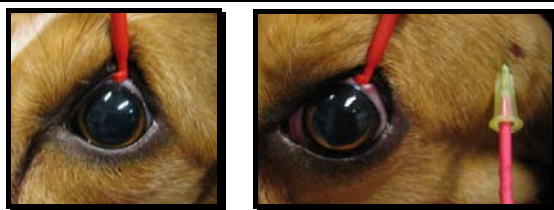


Figura 68: Colocación del electrodo activo en la conjuntiva bulbar y del de referencia a nivel del canto temporal (derecha).

2.3.2.- PROTOCOLO:

Hemos utilizado un protocolo electrorretinográfico recomendado para estudios toxicológicos sobre animales, de reciente publicación (Rosolen *et al.*, 2005d). Tuvo una duración aproximada de 70 minutos y constó de tres partes, cuyo orden cronológico fue el siguiente: una primera parte fotópica, una segunda parte escotópica y una última parte fotópica (**figura 69**).

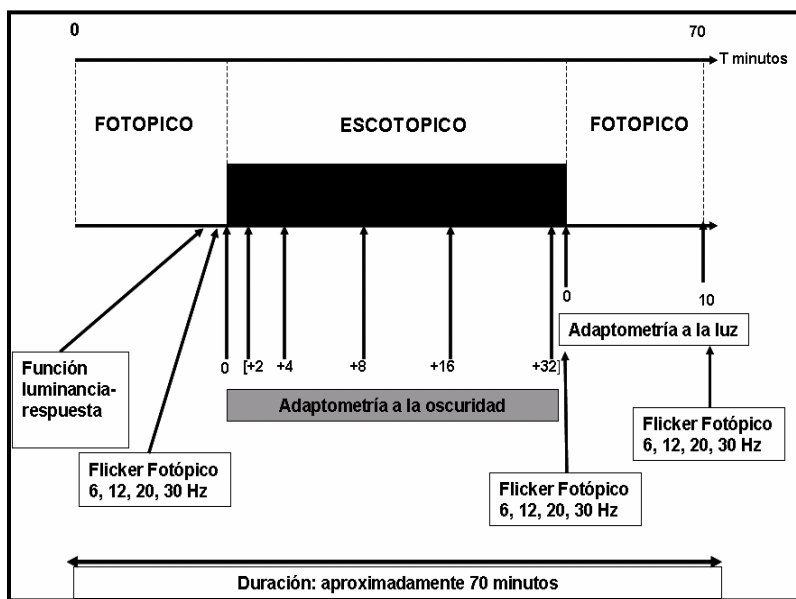


Figura 69: Esquema del protocolo electrorretinográfico utilizado, con una primera parte fotópica, una segunda parte escotópica y una tercera parte de nuevo fotópica (adaptado de Rosolen *et al.*, 2005).

2.3.2.1.- PRIMERA PARTE; FOTÓPICA:

2.3.2.1.1.- FUNCIÓN LUMINANCIA-RESPUESTA (“PHOTOPIC HILL”):

Se realizaron ERGs flash en ambiente fotópico (20 cd/m^2 , respuesta dominada por los conos) para la determinación de I_{max} , A_{max} y de V_{max} . Se realizaron 15 estímulos para cada intensidad con una frecuencia de 1.3 Hz atenuando la intensidad luminosa del flash en 17 escalones de 0.3 log:

FILTRO ND:	INTENSIDAD DEL ESTÍMULO:
Sin filtro	$0.81 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 0.3	$0.51 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 0.6	$0.21 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 0.9	$-0.09 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 1.2	$-0.39 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 1.5	$-0.69 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 1.8	$-0.99 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 2.1	$-1.29 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 2.4	$-1.59 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 2.7	$-1.89 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 3.0	$-2.19 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 3.3	$-2.49 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 3.6	$-2.79 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 3.9	$-3.09 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 4.2	$-3.39 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 4.5	$-3.69 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$
Filtro 4.8	$-3.99 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$

La intensidad a la que la amplitud de la *onda b* fue máxima representó el I_{max} y se utilizó para realizar todos los ERGs flicker y el SF. La amplitud de las *ondas a* y *b* en I_{max} representaron el A_{max} y el V_{max} respectivamente.

2.3.2.1.2.- *FLICKER*:

Se realizó el primer ERG flicker fotópico, con 4 frecuencias temporales de estimulación (6, 12, 20 y 30 Hz). Tuvo una duración de 15 segundos (25 estímulos). Se utilizó como intensidad de estímulo el I_{max} calculado en el “photopic hill”.

2.3.2.2.- SEGUNDA PARTE; ESCOTÓPICA:

2.3.2.2.1- *ADAPTO-ELECTRORRETINOGRAMA (AERG)*:

Se realizaron los ERGs flash con 5 estímulos a una frecuencia de 0.1 Hz y con un flash de nivel luminoso escotópico (filtro ND 2.4 + filtro azul: -2,59 log cd.s.m⁻²) en ambiente escotópico (0 cd/m², respuesta dominada por los bastones).

Se efectuó una medida en el minuto 0 (T0), es decir, justo en el momento de instaurar el ambiente escotópico. Las siguientes medidas se realizaron en el minuto 2 (T2), en el minuto 4 (T4), en el minuto 8 (T8), en el minuto 16 (T16) y la última en el minuto 32 (T32). Consideramos la medida del tiempo 32 (T32), la respuesta de los bastones después de 32 minutos de adaptación a la oscuridad, la respuesta pura de los bastones.

2.3.2.2.2.- *SINGLE FLASH (SF)*:

Se realizó un único estímulo de nivel luminoso fotópico (con I_{max}, calculado en el “photopic hill”) realizado en un ambiente escotópico (0 cd/m²) y después de 32 minutos de adaptación a la oscuridad (respuesta mixta de conos y bastones).

2.3.2.3.- TERCERA PARTE; FOTÓPICA:

En esta última parte del protocolo electrорretinográfico, se trató de evaluar el efecto de adaptación a la luz.

2.3.2.3.1.- *SEGUNDO ERG FLICKER FOTÓPICO*:

Se realizó el segundo ERG flicker fotópico, en el minuto 0 de instauración del ambiente fotópico (T0), con 4 frecuencias temporales de estimulación (6, 12, 20 y 30 Hz). Tuvo una duración de 15 segundos (25 estímulos). Se utilizó como intensidad de estímulo el I_{max} calculado en el “photopic hill”.

2.3.2.3.2.- TERCER ERG FLICKER FOTÓPICO:

Se realizó el tercer ERG flicker fotópico, en el minuto 10 de instauración del ambiente fotópico (T10), con 4 frecuencias temporales de estimulación (6, 12, 20 y 30 Hz). Tuvo una duración de 15 segundos (25 estímulos). Se utilizó como intensidad de estímulo el I_{max} calculado en el “photopic hill”.

2.3.3.- MEDICIÓN DE LAS ONDAS:

- *Onda a*: se midió de la línea base al pico negativo de la onda. Los tiempos de culminación se midieron desde el inicio del flash hasta el pico máximo negativo de la onda (**figura 70**).
- *Onda b*: la medimos desde el pico negativo de la *onda a* hasta el pico positivo de la *onda b*. Los tiempos de culminación también se midió desde el inicio del flash hasta el pico máximo positivo de la onda (**figura 70**).
- Respuesta negativa posterior a la *onda b* (PhNR): se midió la de mayor amplitud de entre todas las curvas de la función luminancia-respuesta. Al igual que para la *onda a*, su amplitud se midió desde la línea de base hasta el pico máximo negativo de la onda. Su tiempo de culminación se midió desde el inicio del flash hasta el pico máximo negativo de la onda (**figura 70**).
- *Onda i*: se eligió la *onda i* de mayor amplitud de entre los ERGs de la función luminancia-respuesta. Su amplitud se midió desde el pico negativo anterior hasta el pico de la propia *onda i*. Su tiempo de culminación se midió desde el inicio del flash hasta el pico máximo de la onda (**figura 70**).

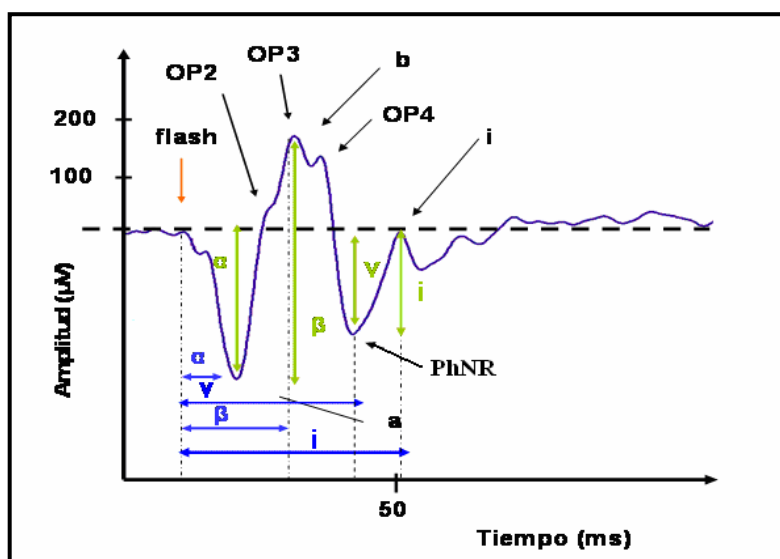


Figura 70: ERG del perro en el que se aprecian las distintas ondas que lo componen. Para una onda determinada, las flechas azules representan los TC y las verdes la amplitud.

- Flicker: para el análisis del flicker, la medición se hizo de pico a pico. Su tiempo de culminación se midió desde el inicio del flash hasta el primer pico positivo (**figura 71**). Solo se midió la amplitud del primer flicker de 30 Hz.

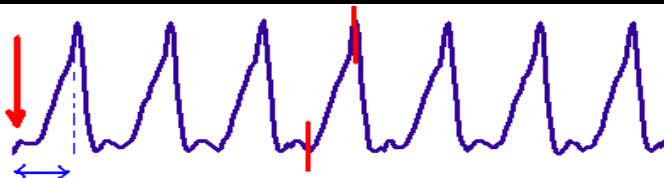


Figura 71: Ejemplo de flicker ERG de 30 Hz y manera de medir la amplitud de pico a pico (líneas rojas) y el TC (flecha azul). La flecha roja representa el inicio del flash.

- Determinación de I_{max} , A_{max} , V_{max} y de K : en la primera parte fotópica del protocolo (“photopic hill”), la intensidad a la cual se obtuvo la mayor amplitud de b se correspondió con I_{max} . Esa amplitud máxima de la *onda b* se correspondió con V_{max} , la *onda a* en I_{max} se correspondió con A_{max} y por último la intensidad de estímulo a la cual la *onda b* obtenida fue igual a la mitad de V_{max} , se correspondió con K (**figura 72**).

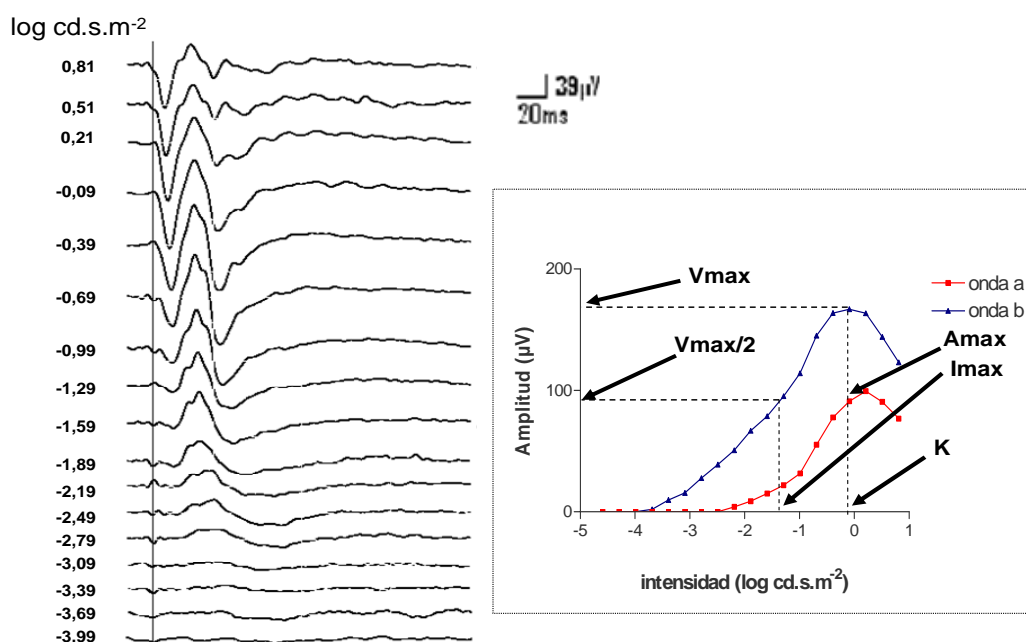


Figura 72: Función luminancia-respuesta (“photopic hill”) del perro (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las *ondas a* y *b* en función de la intensidad del estímulo, así como extracción de I_{max} , V_{max} , A_{max} y K (derecha).

- Potenciales oscilatorios (OPs): Se extrajeron de la curva siguiente a la que produjo el Vmax. Solamente se estudiaron los tres OPs mayores (OP2, OP3 y OP4). Para extraerlos de la curva original se realizó un lisado de la misma aplicando un corte de banda de 100-300 Hz. Su amplitud se midió desde la línea base hasta el pico positivo del OP correspondiente. Su tiempo de culminación se midió desde el inicio del flash hasta el pico máximo positivo del OP correspondiente. Por último se midió la suma de los tres OPs (\sum OPs) así como la relación de cada uno de ellos con respecto a la suma ($OP2/\sum$ OPs, $OP3/\sum$ OPs y $OP4/\sum$ OPs) (figura 73).

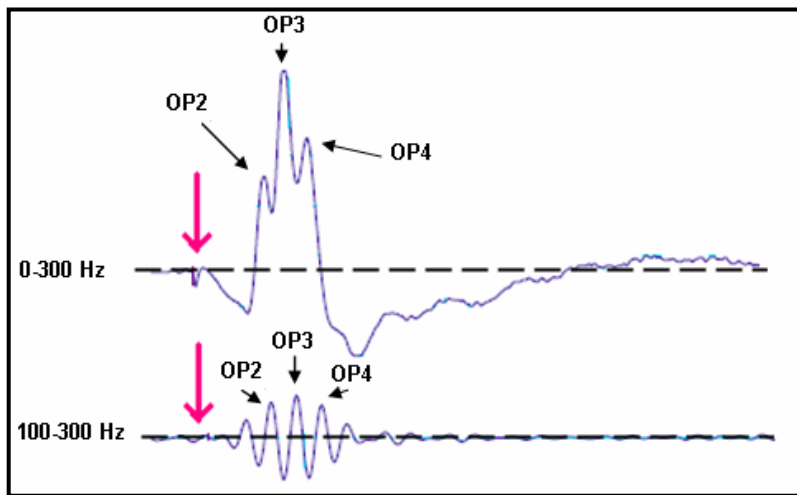


Figura 73: Extracción de los OPs (trazado inferior) por filtrado(100-300 Hz) de la curva original (trazado superior) para su posterior análisis.

- Adapto-electrorretinograma (AERG): se midió en todos los tiempos (T0, T2, T4, T8, T16 y T32) la amplitud de la *onda b* así como su latencia de la misma manera que se hizo para la *onda b* fotópica (figura 70). Solamente se analizó el T32, considerando las respuestas de ese tiempo como las respuestas puras de los bastones.

2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para todas las variables analizadas y todos los tests (Montiani-Ferreira *et al.*, 2004) utilizados se consideró significación con $p < 0,05$.

2.4.1.- DATOS ELECTORRETINOGRÁFICOS Y DIÁMETRO PUPILAR:

Hemos utilizado el programa estadístico Sigma Stat 3.1 para PC (SigmaStat para Windows versión 3.10, Systat Software Inc., CAL, USA). Tanto las amplitudes como los tiempos de culminación de las distintas ondas estudiadas fueron analizados con una ANOVA de dos vías para medidas

repetidas seguido de un *post hoc* de Holm-Sidak que nos permitió saber cuales de los 4 grupos eran diferentes entre sí y si las diferencias encontradas se debían al factor capnia, al factor tipo de anestésico y/o a una interacción entre ambos. Para valorar el efecto de adaptación a la luz se analizó dentro de cada grupo mediante t de Student para medidas pareadas, el segundo (T0) y el tercer flicker (T10). El diámetro pupilar inicial se comparó con el final mediante una t de Student dentro de cada grupo. Los diámetros iniciales y finales entre los cuatro grupos se analizaron con una ANOVA de dos vías para medidas repetidas.

2.4.2.- PARÁMETROS CARDIOVASCULARES, RECUPERACIÓN ANESTÉSICA Y TEMPERATURA (T^a):

La PAM, la FC y la T^a se analizaron dentro de un mismo grupo mediante una ANOVA de una vía para medidas repetidas con un *post hoc* de Dunnet que comparó todos los tiempos con el tiempo 0 (basal). Para la comparación entre grupos de estos parámetros así como de los tiempos de recuperación anestésica se utilizó una ANOVA de dos vías para medidas repetidas en cada tiempo.

2.4.3.- PARÁMETROS RESPIRATORIOS:

Los parámetros respiratorios no fueron analizados ya que fueron controlados formando parte del diseño experimental.

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

RESULTADOS

V.- RESULTADOS:

1.- RESULTADOS ELECTRORETINOGRÁFICOS:

Dentro del estudio electroretinográfico, separaremos las fases fotópicas de las escotópicas y para cada una de ellas reflejaremos los resultados desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo.

1.1.- ANÁLISIS CUANTITATIVO:

En este apartado los valores se representan con la media más la desviación estándar (media \pm SD) con sus unidades correspondientes. Para algunos parámetros se indica el coeficiente de variación (CV).

1.1.1.- PRIMERA PARTE; FOTÓPICA:

Durante la primera parte fotópica estudiamos la función luminancia respuesta y el ERG flicker de 6, 12, 20 y 30 Hz.

1.1.1.1.- FUNCIÓN LUMINANCIA-RESPUESTA (“PHOTOPIC HILL”):

La función luminancia luminancia-respuesta se realizó en los 4 grupos con un rango de estímulos de entre $0,81 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$ y $-3,99 \log \text{ cd.s.m}^{-2}$ con atenuaciones de 0,3 log, realizando así 17 intensidades distintas para cada animal en cada uno de los 4 grupos.

En esos 17 ERGs se halló la intensidad del estímulo para el cual la *onda b* resultó ser mayor (I_{\max}), la amplitud de *b* con el I_{\max} (V_{\max}) así como su tiempo de culminación (TC), la amplitud de la *onda a* con el I_{\max} (A_{\max}) así como su TC y finalmente la intensidad requerida para alcanzar una *onda b* de amplitud igual a la mitad de V_{\max} (K). También medimos la amplitud máxima de la negatividad posterior a la *onda b* y su TC. Además calculamos la relación entre la amplitud de la *onda b* y de la *onda a* (b/a) en el ERG correspondiente al V_{\max} . Se midieron las amplitudes de los tres potenciales oscilatorios mayores (OP2, OP3 y OP4), así como su TC, además de su suma y la proporción de cada uno de ellos. Por último se midió la amplitud y el TC de la respuesta negativa posterior a la *onda b* (PhNR) y de la *onda i*.

1.1.1.1.1.- I_{max} ($\log cd.s.m-2$):

1.1.1.1.1.1.- Valores:

El I_{max} para el grupo ISON osciló entre un valor mínimo de -0,39 y un máximo de 0,21, su valor medio fue de $-0,19 \pm 0,24$. Para el grupo ISOH el I_{max} tuvo un máximo de 0,21 y un mínimo de -0,09 con una media de $0,06 \pm 0,16$. Para el grupo SEVON hallamos un I_{max} máximo de 0,51, un mínimo de -0,39, una media de $-0,09 \pm 0,38$. Por último el grupo SEVOH tuvo un I_{max} que varió desde 0,21 hasta -0,09, con una media de $0,06 \pm 0,16$ (**tabla 3**).

1.1.1.1.1.2.- Comparativa de los 4 grupos:

No hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos para los valores de I_{max} (**tabla 3**).

1.1.1.1.2.- AMPLITUD DE LA ONDA b (μV) EN EL I_{max} (V_{max}) Y SU TC (ms):

1.1.1.1.2.1.- Valores:

El valor máximo de V_{max} para el grupo ISON fue de 189,5 y el mínimo de 158,5, su media fue de $170,6 \pm 12,1$. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 107 y 171,5 siendo su media $132,6 \pm 24,9$. En el grupo SEVON, el V_{max} varió entre 189 y 148 con una media de $170,9 \pm 14,4$. En el último grupo (SEVOH) el valor máximo de V_{max} fue de 166 y el mínimo de 105 con una media de $130,2 \pm 22,8$ (**gráfico 1 y tabla 3**).

El tiempo de culminación de la *onda b* en el V_{max} para el grupo ISON osciló entre 27 y 34 con una media de $28,3 \pm 3,4$. Para ISOH varió entre 25,5 y 32,5, su media fue de $28,5 \pm 2,4$. El tiempo de culminación del grupo SEVON tuvo un máximo de 34,5 y un mínimo de 27,25, su media fue de $30,9 \pm 3,3$. El grupo SEVOH tuvo un tiempo de culminación máximo de 30,5, mínimo de 27, una media de $29 \pm 1,3$ (**tabla 3**).

1.1.1.1.2.2.- Comparativa de los 4 grupos:

El V_{max} fue significativamente mayor en los grupos ISON y SEVON en comparación con los grupos ISOH y SEVOH. Los grupos ISON y SEVON no mostraron diferencias significativas entre sí y los grupos ISOH y SEVOH tampoco (**gráfico 1 y tabla 3**). Los resultados de la ANOVA de dos vías indicaron que las diferencias se debieron solamente al factor CAPNIA.

No hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos para los valores del TC (**tabla 3**).

1.1.1.1.3.- AMPLITUD EN VALOR ABSOLUTO (μV) Y TC (ms) DE LA ONDA a EN Imax (Amax):

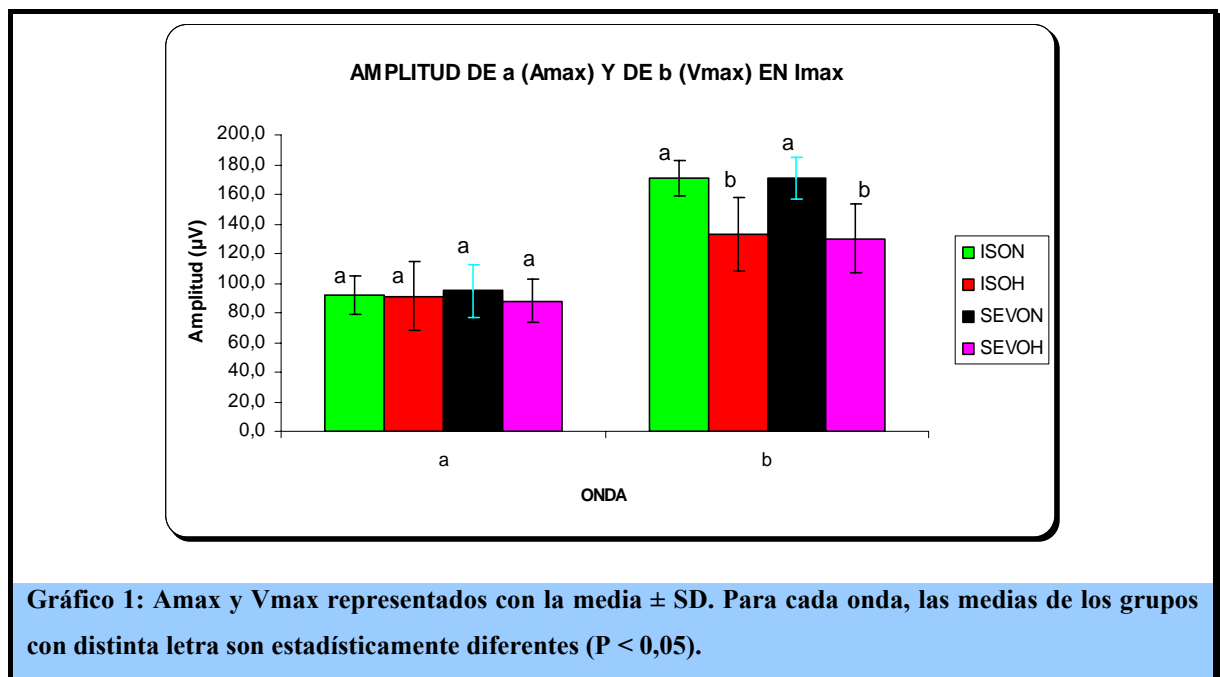
1.1.1.1.3.1.- Valores:

La amplitud de la *onda a* en Imax en el grupo ISON tuvo un máximo de 112,5 y un mínimo de 80, su media fue de $92 \pm 13,4$. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 128,5 y 60, su media fue de $91 \pm 23,2$. En el grupo SEVON la amplitud de *a* tuvo un máximo de 115 y un mínimo de 69, con una media de $94,7 \pm 17,6$. Para el grupo SEVOH el máximo fue de 67 y el mínimo de 105, la media fue de $87,8 \pm 14,6$ (**gráfico 1 y tabla 3**).

El tiempo de culminación de la *onda a* en Imax para el grupo ISON osciló entre 10,3 y 12,5, la media fue de $11,4 \pm 0,9$. En el grupo ISOH varió entre 12,3 y 9,3, tuvo una media de $11,2 \pm 1,1$. El grupo SEVON tuvo un valor máximo 12,5 de y un mínimo de 10,3, con una media $11,9 \pm 1,2$. Por último el grupo SEVOH osciló entre 12,5 y 11,3, su media fue de $11,7 \pm 0,5$ (**tabla 3**).

1.1.1.1.3.2.- Comparativa de los 4 grupos:

No hubo diferencias significativas ni en la amplitud ni en los TCs entre los cuatro grupos estudiados (**gráfico 1 y tabla 3**).



		ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
		Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)
<i>Onda a</i>	AMPLITUD (µv)	-92,0±13,4 a	15	-91,0±23,2 a	26	-94,7±17,6 a	19	-87,6±14,6 a	17
	TC (ms)	11,4±0,9 a	8	11,2±1,1 a	9	11,9±1,2 a	10	11,7±0,5 a	5
<i>Onda b</i>	AMPLITUD (µv)	170,6±12,1 a	7	132,6±24,9 b	19	170,9±14,4 a	8	130,2±22,8 b	18
	TC (ms)	28,3±3,4 a	12	28,5±2,4 a	8	30,9±3,3 a	11	29,0±1,3 a	4
I _{max} (log cds/m ²)		-0,19±0,24 a	-	0,06±0,16 a	-	-0,09±0,38 a	-	0,06±0,16 a	-

Tabla 3: Amplitud y TC de las ondas a y b en I_{max} (A_{max} y V_{max}), así como I_{max}. Para cada parámetro, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes (P < 0,05).

1.1.1.1.4.- RELACIÓN b/a EN I_{max}:

1.1.1.1.4.1.- Valores:

En el grupo ISON la relación b/a tuvo un valor máximo de 2 y uno mínimo de 1,7, su media fue de $1,9 \pm 0,1$. Para el grupo ISOH el máximo lo encontramos en 1,8 y el mínimo en 1,3 y la media en $1,5 \pm 0,2$. En los animales del grupo SEVON la relación b/a tuvo un máximo de 2,5 y un mínimo de 1,5, su media fue de $1,9 \pm 0,4$. Para el grupo de SEVOH osciló entre 1,4 y 1,7, su media fue de $1,5 \pm 0,2$ (gráfico 2 y tabla 4).

1.1.1.1.4.2.- Comparativa de los 4 grupos:

La relación b/a fue significativamente mayor en los grupos ISON y SEVON en comparación con los grupos ISOH y SEVOH. Los grupos ISON y SEVON no mostraron diferencias significativas entre sí y los grupos ISOH y SEVOH tampoco (gráfico 2 y tabla 4). Los resultados de la ANOVA de dos vías indicaron que las diferencias se deben solamente al factor CAPNIA.

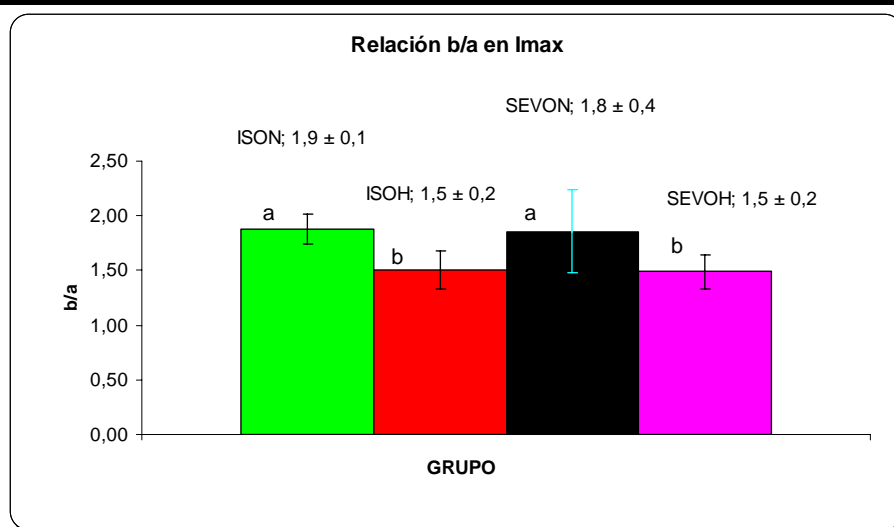


Gráfico 2: Relación b/a en I_{max}, representada con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

1.1.1.1.5.- K ($\log \text{cd.s.m}^{-2}$):

1.1.1.1.5.1.- Valores:

En el grupo ISON la K varió entre -1,91 y -1,17, su media fue de $-1,44 \pm 0,32$. Para el grupo ISOH osciló entre -1,25 y -0,9, la media fue de $-1,08 \pm 0,12$. En el grupo SEVON la K varió entre -1,42 y -0,93, la media se encontró en $-1,15 \pm 0,18$. El grupo SEVOH tuvo una K máxima de -0,9 y un mínimo de -1,65, una media de $-1,11 \pm 0,28$ (**gráfico 3 y tabla 4**).

1.1.1.1.5.2.- Comparativa de los 4 grupos:

El valor de K fue significativamente menor en el grupo ISON con respecto al grupo ISOH, en el resto de los grupos no hubo diferencias significativas. Los resultados de la ANOVA de dos vías indicaron que las diferencias encontradas no dependen del factor TIPO DE ANESTESICO y si dependen del factor CAPNIA así como de la interacción entre ambos (**gráfico 2 y tabla 4**).

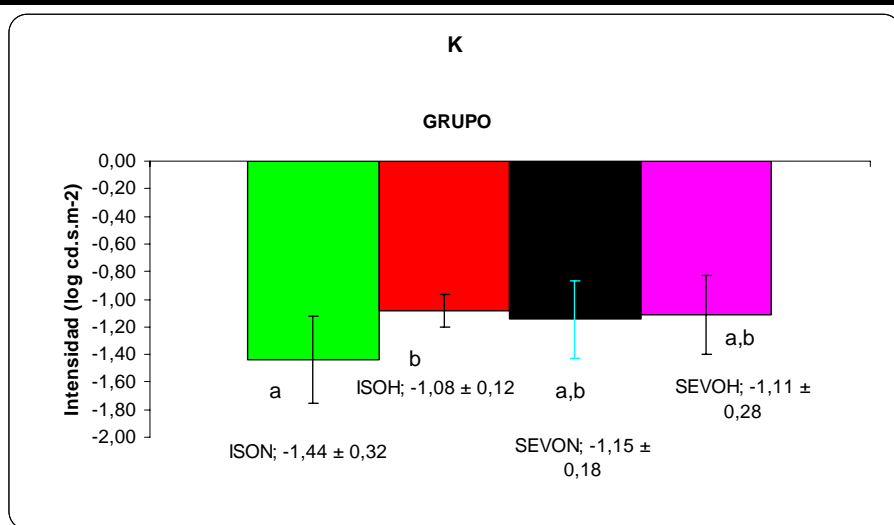


Gráfico 3: K representada con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

	ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)
Relación b/a en I _{max}	1,9 \pm 0,1 a	8	1,5 \pm 0,2 b	12	1,9 \pm 0,4 a	20	1,5 \pm 0,2 b	10
K	-1,4 \pm 0,3 a	22	-1,1 \pm 0,1 b	11	-1,1 \pm 0,2 ab	16	-1,1 \pm 0,3 ab	25

Tabla 4: Relación b/a y K. Para cada parámetro, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

1.1.1.1.6.- Amplitud en valor absoluto (μV) y TC (ms) de la respuesta negativa posterior a la onda b; PhNR:

1.1.1.1.6.1.- Valores:

En el grupo ISON la deflexión negativa posterior a la *onda b* osciló entre 96 y 76, con una media de $86,7 \pm 8,5$. Para el grupo ISOH varió entre 100 y 66, con una media de $78,5 \pm 12,3$. El grupo SEVON tuvo un máximo de 111 y un mínimo de 67, una media de $93,2 \pm 8$. En el último grupo encontramos valores que oscilaron entre 68 y 89, la media fue de $74,5 \pm 8$ (tabla 5).

Los tiempos de culminación para el grupo ISON variaron entre 45 y 48,6, con una media $46,8 \pm 1,3$. En el grupo ISOH el máximo fue de 48,6 y el mínimo de 45, la media fue de $46,8 \pm 1,5$. Para el grupo SEVON los valores oscilaron entre 45,5 y 47, la media fue de $46,1 \pm 0,7$. En el último grupo

(SEVOH) el tiempo de culminación máximo fue de 47,3, el mínimo fue de 45,5, la media de $46,6 \pm 0,7$ (tabla 5).

1.1.1.1.6.2.- Comparativa de los 4 grupos:

No hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos estudiados (tabla 5).

1.1.1.1.7.- AMPLITUD (μV) Y TC (ms) DE LA Onda i:

1.1.1.1.7.1.- Valores:

La amplitud de la *onda i* en el grupo de ISON tuvo un máximo de 20 y un mínimo de 10, su media fue de $17,2 \pm 4,2$. Para el grupo de ISOH el máximo fue de 25 y el mínimo de 10, su media se situó en $18,5 \pm 5,5$. En el grupo SEVON el valor máximo fue de 30 y el mínimo de 10, la media la encontramos en $22,3 \pm 7,9$. Para el grupo SEVOH el mínimo se situó en 10 y el máximo en 28, su media fue de $19,3 \pm 7,3$ (tabla 5).

El tiempo de culminación de la *onda i* osciló entre 49,5 y 52 en el grupo y tuvo una media de $50,7 \pm 0,8$ en el grupo ISON. Para el grupo ISOH encontramos un máximo de 51,8 y un mínimo de 50, la media fue de $50,8 \pm 0,7$. Para los animales del grupo SEVON el máximo se registró en 51,8 y el mínimo en 51, la media fue de $51,4 \pm 0,4$. En el grupo SEVOH el mínimo fue de 50,8 y el máximo de 52,5, la media la encontramos en $51,7 \pm 0,6$ (tabla 5).

1.1.1.1.7.2.- Comparación entre los 4 grupos:

La amplitud así como la TC de la *onda i* no mostraron diferencias significativas en ninguno de los 4 grupos (tabla 5).

		ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
		Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)
PhNR	AMPLITUD (μv)	-86,7 \pm 8,5	10	-78,5 \pm 12,3	16	-93,2 \pm 8,0	9	-74,5 \pm 8,0	9
	TC (ms)	46,8 \pm 1,3	3	46,8 \pm 1,5	3	46,1 \pm 0,7	2	46,6 \pm 0,7	2
Onda i	AMPLITUD (μv)	17,2 \pm 4,2	25	18,5 \pm 5,5	30	22,3 \pm 7,9	36	19,3 \pm 7,3	38
	TC (ms)	50,7 \pm 0,8	2	50,8 \pm 0,7	1	51,4 \pm 0,4	1	51,7 \pm 0,6	1

Tabla 5: Amplitud y TC de la *onda i* y de la PhNR. No hubo diferencias significativas entre grupos.

1.1.1.1.8.- POTENCIALES OSCILATORIOS; OPs:

1.1.1.1.8.1.- Amplitud (μ V) OP2:

La amplitud máxima del OP2 en el grupo ISON varió entre 9 y 3 y la media fue de $6,5 \pm 2$. Para el grupo ISOH el máximo fue de 7,5 y el mínimo de 3,5 con una media de $5,8 \pm 1,6$. En el grupo SEVON el máximo fue de 9,5 y el mínimo de 3 y la media de $6,7 \pm 2,6$.

Para el grupo SEVOH el máximo se encontró en 6 y el mínimo en 2,5 con una media de $4,8 \pm 1,4$ (**tabla 6**).

1.1.1.1.8.2.- Amplitud (μ V) OP3:

La amplitud máxima del OP3 en el grupo ISON fue de 18 y la mínima de 5, con una media de $10,8 \pm 5,9$. En el grupo ISOH los valores oscilaron entre 17 y 5,5, con una media de $8,8 \pm 4,5$. Para el grupo SEVON la amplitud varió entre 19 y 6, la media fue de $12,8 \pm 5,1$. En el grupo SEVOH la amplitud varió entre 13 y 5 y la media fue de $8,6 \pm 3,1$ (**tabla 6**).

1.1.1.1.8.3.- Amplitud (μ V) OP4:

La amplitud máxima del OP4 en el grupo ISON osciló entre 3,2 y 6,5 y la media fue de $4,8 \pm 1,2$. Para el grupo ISOH el máximo fue de 6,2 y el mínimo de 3,5 con una media de $4,6 \pm 1,1$. En el grupo SEVON el máximo fue de 7,1 y el mínimo de 3 y la media de $5 \pm 1,4$. Para el grupo SEVOH el máximo se encontró en 6 y el mínimo en 4,1 con una media de $4,6 \pm 0,6$ (**tabla 6**).

1.1.1.1.8.4.- Sumatorio de OPs (μ V):

Para el grupo ISON, la suma de los 3 OPs medidos osciló entre 30 y 12, la media fue de $22,1 \pm 7,5$. Para el grupo ISOH, el sumatorio de OPs tuvo un máximo de 26,5 y un mínimo de 13,5, su media fue de $19,2 \pm 5,1$. En el grupo SEVON varió entre 15 y 33,5, su media fue de $24,5 \pm 7,1$. En los animales del grupo SEVOH, la amplitud osciló entre 11 y 22,5, la media fue de $18 \pm 4,5$. La proporción media de la amplitud que aportan cada uno de los 3 OPs a la suma de los mismos, fue de 30, 50, y 20 % para los OP2, OP3 y OP4 respectivamente en los 4 grupos (**tabla 6**).

1.1.1.1.8.5.- TC (ms) Del OP2:

En el grupo ISON el máximo fue de 28,8 y el mínimo de 23,9, la media se encontró en $26,7 \pm 1,7$. Para el grupo ISOH el máximo fue de 29,1 y el mínimo de 25,7 con una media de $27,2 \pm 1,4$. Para el grupo SEVON los valores oscilaron entre 28,2 y 25,8 y la media fue de $27 \pm 0,9$. En el grupo SEVOH el máximo fue de 29,8 y el mínimo de 25,3 y la media de $27,5 \pm 1,6$ (**tabla 7**).

1.1.1.1.8.6.- TC (ms) Del OP3:

Para el grupo ISON el máximo fue de 37 y el mínimo de 34,2 con una media de $35,5 \pm 1$. En el grupo ISOH los valores oscilaron entre 38 y 34 con una media de $36,2 \pm 1,5$. Para los animales del grupo SEVON los valores oscilaron entre 36,3 y 34 con una media $35,1 \pm 0,8$. En el grupo SEVOH los valores variaron entre 37 y 34,7 con una media de $36,1 \pm 1,1$ (**tabla 7**).

1.1.1.1.8.7.- TC (ms) Del OP4:

Para el grupo ISON el máximo fue de 42,8 y el mínimo de 46,5 con una media de $43,9 \pm 1,4$. En el grupo ISOH los valores oscilaron entre 38 y 34 con una media de $44,8 \pm 1,9$. Para los animales del grupo SEVON los valores oscilaron entre 43 y 48 con una media $43,1 \pm 1,2$. En el grupo SEVOH los valores variaron entre 43 y 45 con una media de $43,9 \pm 0,6$ (**tabla 7**).

1.1.1.1.8.8.- Comparativa de los 4 grupos:

No hubo diferencias significativas en ninguno de los OPs, ni en su amplitud, ni en su tiempo de culminación, en ninguno de los cuatro grupos (**tablas 6 y 7**).

Tabla 6: Amplitud de los OPs 2, 3 y 4, así como el sumatorio (Σ OPs) y la relación de cada uno de ellos con el total. No hubo diferencias significativas entre grupos.

		ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
		Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)
OP2	AMPLITUD (μ v)	6,5 \pm 2,0	30	5,8 \pm 1,6	28	6,7 \pm 2,6	40	4,8 \pm 1,4	30
OP3	AMPLITUD (μ v)	10,8 \pm 5,9	55	8,8 \pm 4,5	52	12,8 \pm 5,1	40	8,6 \pm 3,1	36
OP4	AMPLITUD (μ v)	4,8 \pm 1,2	25	4,6 \pm 1,1	24	5 \pm 1,4	28	4,6 \pm 0,6	13
Σ OPs	AMPLITUD (μ v)	22,1 \pm 7,5	-	19,2 \pm 5,1	-	24,5 \pm 7,1	-	18 \pm 4,5	-

Resultados

OP2/ Σ OPs	0,3 \pm 0,1	-	0,3 \pm 0,1	-	0,3 \pm 0,1	-	0,3 \pm 0,1	-
OP3/ Σ OPs	0,5 \pm 0,1	-	0,5 \pm 0,1	-	0,5 \pm 0,1	-	0,5 \pm 0,1	-
OP4/ Σ OPs	0,2 \pm 0,1	-	0,2 \pm 0,1	-	0,2 \pm 0,1	-	0,2 \pm 0,1	-

Tabla 7: Amplitud de los OPs 2, 3 y 4, así como el sumatorio (Σ OPs) y la relación de cada uno de ellos con el total. No hubo diferencias significativas entre grupos.

		ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
		Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)
OP2	TC (ms)	26,7 \pm 1,7	7	27,2 \pm 1,4	5	27,0 \pm 0,9	3	27,5 \pm 1,6	6
OP3	TC (ms)	35,5 \pm 1,0	3	36,2 \pm 1,5	4	35,1 \pm 0,8	2	36,1 \pm 1,1	3
OP4	TC (ms)	43,9 \pm 1,4	3	44,8 \pm 1,9	4	43,1 \pm 1,2	3	43,9 \pm 0,6	1

Tabla 8: TC de los OPs 2, 3 y 4. No hubo diferencias significativas entre grupos.

1.1.1.1.9.- PRIMER FLICKER:

1.1.1.1.9.1.- Amplitud (μ V) del flicker 6 Hz:

La amplitud del flicker de 6 Hz tuvo un máximo de 126, un mínimo de 95 con una media de 104,3 \pm 11,8 en el grupo ISON. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 94 y 67 y la media fue de 81,6 \pm 8,7. Para el grupo SEVON el valor máximo se encontró en 121,5 y la mínimo en 87,5, la media fue de 105,5 \pm 13,4. En el grupo SEVOH los valores variaron entre 98 y 61, la media encontrada fue de 84 \pm 14,6 (gráfico 4 y tabla 8).

1.1.1.1.9.2.- Amplitud (μ V) del flicker 12 Hz:

La amplitud tuvo un máximo de 130,5 y un mínimo de 95 y una media 106,7 \pm 15,9 en el grupo ISON. Para el grupo ISOH el máximo fue de 110,5 y la mínima de 68,5, la media fue 95,6 \pm 16,3. En el grupo SEVON el máximo estuvo en 134 y el mínimo 81 y la media en 108,2 \pm 18,2. Para los animales del grupo SEVOH el valor máximo estuvo en 119, el mínimo en 79 y la media la encontramos en 98,4 \pm 15,8 (gráfico 4 y tabla 8).

1.1.1.1.9.3.- Amplitud (μ V) del flicker 20 Hz:

Para el grupo ISON el máximo fue de 175, el mínimo de 113,5 y la media $131,9 \pm 23,1$. En el grupo ISOH el valor máximo lo encontramos en 138,3 y el mínimo en 91, la media fue de $120,1 \pm 18,5$. Para el grupo SEVON los valores oscilaron entre 153,5 y 115, la media fue de $132,9 \pm 16,1$. En el grupo SEVOH los valores variaron entre 154 y 86, la media fue de $121,6 \pm 24,3$ (**gráfico 4 y tabla 8**).

1.1.1.1.9.4.- Amplitud (μV) y TC (ms) del flicker 30 Hz:

La amplitud del flicker de 20 Hz en el grupo ISON tuvo un máximo de 195 y un mínimo de 120, la media fue de $152 \pm 24,1$. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 199 y 111,5 y la media fue de $155,3 \pm 30,6$. En el grupo SEVON los valores variaron entre 190 y 130,5, la media estuvo en $152,4 \pm 20,7$. En el SEVOH el máximo fue de 174 y el mmínimo 118 y la media $156,1 \pm 24,8$ (**gráfico 4 y tabla 8**).

El tiempo de culminación máximo para el grupo ISON fue de 26,8 y el mínimo de 25,7 con una media de $25,8 \pm 0,4$. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 28,9 y 25,7 con una media en $27,7 \pm 1,2$. En el grupo SEVON los valores variaron entre 27,8 y 23,6 con una media de $25,9 \pm 1,6$. En el último grupo (SEVOH) el tiempo de culminación máximo fue 27,8 y el mínimo 26 con una media $27,2 \pm 0,8$ (**gráfico 5**).

1.1.1.1.9.5.- Comparativa de los 4 grupos:

La amplitud del flicker de 6 Hz fue significativamente mayor en los grupos ISON y SEVON en comparación con los grupos ISOH y SEVOH. Los grupos ISON y SEVON no mostraron diferencias significativas entre sí y los grupos ISOH y SEVOH tampoco (**gráfico 4 y tabla 8**). Los resultados de la ANOVA de dos vías indicaron que las diferencias se deben solamente al factor CAPNIA.

En las frecuencias de flicker de 12, 20 y 30 Hz no hubo diferencias significativas entre los distintos grupos (**gráfico 4 y tabla 8**).

El tiempo de culminación fue significativamente menor en los grupos ISON y SEVON en comparación con los grupos ISOH y SEVOH. Los grupos ISON y SEVON no mostraron diferencias significativas entre sí y los grupos ISOH y SEVOH tampoco (**gráfico 5**). Los resultados de la ANOVA de dos vías indicaron que las diferencias se deben solamente al factor CAPNIA.

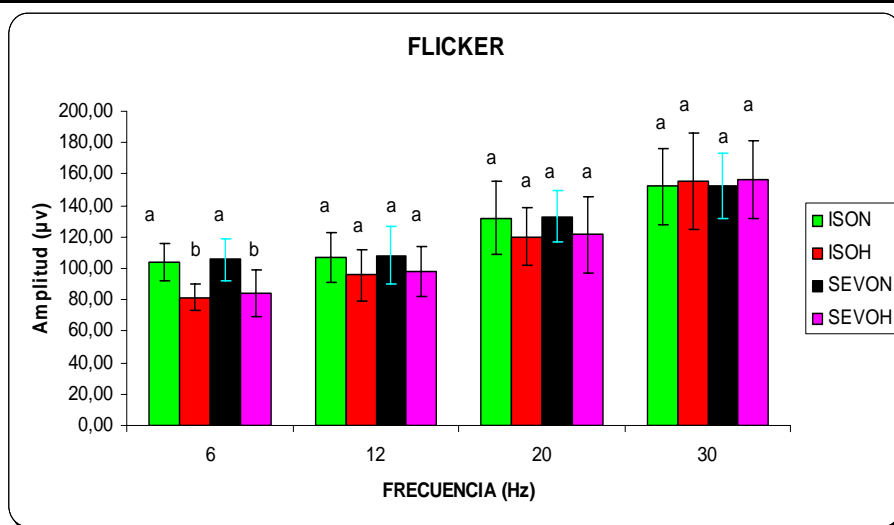


Gráfico 4: Amplitud del primer flicker en las 4 frecuencias realizadas (6, 12, 20 y 30 Hz), representada con la media \pm SD. Para cada frecuencia, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

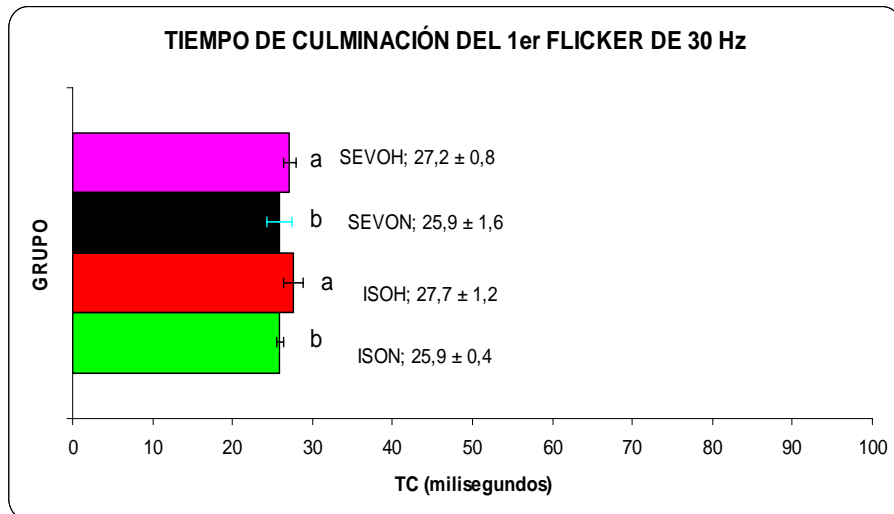


Gráfico 5: TC del primer flicker de 30 Hz, representado con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

	ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)
6 Hz	104,3±11,8 a	11	81,6±8,7 b	11	105,5±13,4 a	13	84,0±14,6 b	17
12 Hz	106,7±15,9 a	15	95,6±16,3 a	17	108,2±18,2 a	17	98,4±15,8 a	16
20 Hz	132,0±23,1 a	18	120,1±18,5 a	15	132,9±16,1 a	12	121,6±24,3 a	20
30 Hz	152,1±24,1 a	16	155,3±30,6 a	20	152,5±20,7 a	14	156,1±24,8 a	16

Tabla 9: Amplitud del primer flicker en las 4 frecuencias realizadas (6, 12, 20 y 30). Para cada frecuencia, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

1.1.2.- SEGUNDA PARTE; ESCOTÓPICA:

Durante la parte escotópica del experimento se realizó el adapto-electrorretinograma (AERG) y el single flash (SF).

1.1.2.1.- ADAPTO-ELECTRORRETINOGRAMA (AERG):

Hemos medido la amplitud y el TC de la *onda b* durante los tiempos (minutos) 0, 2, 4, 8, 16 y 32 del AERG.

1.1.2.1.1.- ISON:

1.1.2.1.1.1.- Amplitud (μV):

En el grupo ISON la *onda b* en el tiempo 0 (T0) del AERG tuvo un máximo de 38,5 y un mínimo de 10 y la media fue de $26,8 \pm 10,1$. En el minuto 2 (T2), la *onda b* osciló entre 48 y 24 con una media de $34 \pm 9,2$. En el minuto 4 (T4), la *onda b* osciló entre 51 y 29 y su valor medio fue de $38,9 \pm 9,1$. En el minuto 8 (T8), la *onda b* varió entre 78,5 y 34 con una media de $52 \pm 16,4$. En el tiempo 16 (T16), el máximo fue 96 y el mínimo de 46 con una media de $67,8 \pm 17,5$. En el último tiempo (T32), la amplitud de *b* varió entre 110,5 y 68 con una media de $89,4 \pm 14,7$ (**gráfico 6 y tabla 9**).

1.1.2.1.1.2.- TC (ms):

El tiempo de culminación de la *onda b* en T0 varió entre 45 y 42 y su media fue de $43,7 \pm 1,1$. En T2 los valores oscilaron entre 46 y 44 con una media de $45,1 \pm 0,8$. En T4 el tiempo de culminación varió entre 48 y 45 con una media de $46,4 \pm 1$. En T8 el tiempo de culminación máximo fue de 50,5 y el mínimo de 47 con una media de $47,9 \pm 1,3$. En T16 el máximo fue de 53 y el mínimo de 48, la media fue de $50,4 \pm 2,1$. En T32 los valores variaron entre 56 y 50 con una media de $52,3 \pm 2,5$ (**tabla 10**).

1.1.2.1.2- ISOH:

1.1.2.1.2.1.- Amplitud (μV):

En T0 la amplitud de *b* osciló entre 29 y 5 con una media de $13,8 \pm 8,5$. En T2 la amplitud de *b* tuvo un valor máximo de 33 y uno mínimo de 6, la media fue de $16,7 \pm 9,4$. En T4 osciló entre 35 y 7,5 con una media de $21,2 \pm 10,8$. En T8 varió entre 48,5 y 9 con una media de $27,8 \pm 15,6$. En T16 el máximo fue de 60,5 y un mínimo de 12 con una media de $35,8 \pm 19,3$. En T32 la amplitud de la *onda b* máxima fue de 75 y la mínima de 35,5 con una media de $58,2 \pm 17,6$ (**gráfico 6 y tabla 9**).

1.1.2.1.2.2.- TC (ms):

En T0 el tiempo máximo de culminación de la *onda b* fue de 46 y el mínimo de 39,5 con una media de $42,7 \pm 2,3$. En T2 varió entre 53 y 40 con una media de $45,7 \pm 4,2$. En T4 osciló entre 55 y 43 con una media de $47,6 \pm 4,1$. En T8 los valores se movieron entre 55,5 y 44 con una media de $49,4 \pm 4,1$. En T16 oscilaron entre 57,5 y 46 y su media fue de $51,1 \pm 4,1$. En T32 variaron entre 58 y 47,5, su media fue de $52,3 \pm 3,8$ (**tabla 10**).

1.1.2.1.3- SEVON:

1.1.2.1.3.1.- Amplitud (μV):

La amplitud máxima de la *onda b* en T0 fue de 32 y la mínima de 10 y la media fue de $18,2 \pm 7,8$. En T2 varió entre 46,5 y 15 y la media fue de $26 \pm 11,8$. En T4 osciló entre 54 y 21, la media fue de $33,3 \pm 11,7$. En T8 varió entre 68 y 36 con una media de $45,2 \pm 11,8$. En T16 el máximo fue de 99 y el mínimo de 48 con una media de $65 \pm 17,5$. En T32 osciló entre 130 y 66,5 con una media de $93,4 \pm 24,1$ (**gráfico 6 y tabla 9**).

1.1.2.1.3.2.- TC (ms):

En T0 el tiempo de culminación varió entre 44,3 y 40 con una media de $42,7 \pm 1,7$. En T2 osciló entre 48 y 42, su media fue de $44,8 \pm 2,2$. En T4 se movió entre 53 y 44,5 con una media de $47,3 \pm 3,3$. En T8 varió entre 54 y 47 con una media de $48,7 \pm 3$. En T16 osciló entre 55 y 49 con una media de $50,8 \pm 2,5$. En T32 el tiempo de culminación máximo fue de 56,5 y el mínimo de 51, la media fue de $52,3 \pm 2,4$ (**tabla 10**).

1.1.2.1.4- SEVOH:**1.1.2.1.4.1.- Amplitud (μV):**

La amplitud de la *onda b* en T0 osciló entre 22 y 5 con una media de $10,2 \pm 6,3$. En T2 osciló entre 32,5 y 6 con una media de $14,8 \pm 9,4$. En T4 varió entre 37 y 7 con una media de $17,3 \pm 10,8$. En T8 se movió entre 48 y 11 con una media de 22 ± 14 . En T16 el máximo fue de 69 y el mínimo de 14, la media se encontró $32,2 \pm 20,4$. En T32 osciló entre 91 y 33 con una media de $56,2 \pm 22,2$ (**gráfico 6 y tabla 9**).

1.1.2.1.4.2.- TC (ms):

El tiempo de culminación de la *onda b* en T0 varió entre 47 y 40 con una media de $42,6 \pm 2,7$. En T2 osciló entre 51 y 41 con una media de $44,9 \pm 3,5$. En T4 se movió entre 54 y 42, la media fue de $46,7 \pm 4,2$. En T8 osciló entre 55 y 44 con una media de $48 \pm 3,9$. En T16 varió entre 57 y 46,5 con una media de $50,1 \pm 3,8$. En T32 el máximo estuvo en 59, el mínimo en 48 y la media en $51,8 \pm 4,2$ (**tabla 10**).

1.1.2.1.5.- COMPARATIVA DE LA AMPLITUD Y DEL TC DE LA ONDA b EN T32 ENTRE LOS 4 GRUPOS:

La amplitud de la *onda b* en el minuto 32 de adaptación a la oscuridad fue significativamente mayor en los grupos ISON y SEVON en comparación con los grupos ISOH y SEVOH. Los grupos ISON y SEVON no mostraron diferencias significativas entre sí y los grupos ISOH y SEVOH tampoco (**gráfico 6 y tabla 9**). Los resultados de la ANOVA de dos vías indicaron que las diferencias se deben solamente al factor CAPNIA.

El tiempo de culminación no mostró diferencias significativas entre los 4 grupos (**tabla 10**).

Resultados

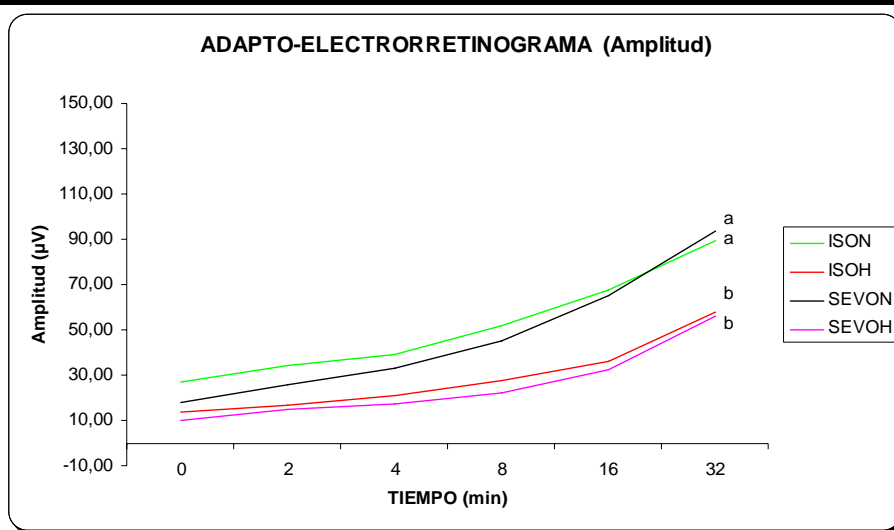


Gráfico 6: Amplitud de la *onda b* durante el AERG (t0, t2, t4, t8, t16 y t32). Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD (ver tabla 9) para facilitar la visualización de las curvas. En t32, para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

AMPLITUD Onda b (µV)	ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
Tiempo (min)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)
T ₀	26,8±10,1	38	13,8±8,5	62	18,2±7,8	43	10,2±6,3	62
T ₂	34,0±9,2	27	16,7±9,4	57	26,0±11,8	46	14,8±9,4	64
T ₄	38,9±9,1	23	21,2±10,8	51	33,3±11,7	35	17,3±10,8	62
T ₈	52,0±16,4	32	27,8±15,6	56	45,2±11,8	26	22,0±14,0	64
T ₁₆	67,8±17,5	26	35,8±19,3	54	65,0±17,5	27	32,2±20,4	63
T ₃₂	89,4±14,7 a	16	58,2±17,6 b	30	93,4±24,1 a	26	56,2±22,2 b	40

Tabla 10: Amplitud de la *onda b* durante el AERG (t0, t2, t4, t8, t16 y t32). En t32, para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

TC Onda b (ms)	ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
Tiempo (min)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)	Media±SD	CV (%)
t_0	43,7±1,1	2	42,7±2,3	5	42,7±1,7	4	42,6±2,7	6
t_2	45,1±0,8	2	45,7±4,2	9	44,8±2,2	5	44,9±3,5	8
t_4	46,4±1,0	2	47,6±4,1	9	47,3±3,3	7	46,7±4,2	9
t_8	47,9±1,3	3	49,4±4,1	8	48,7±3,0	6	48,0±3,9	8
t_{16}	50,4±2,1	4	51,1±4,1	8	50,8±2,5	5	50,1±3,8	8
t_{32}	52,3±2,5	5	52,3±3,8	7	52,3±2,4	5	51,8±4,2	8

Tabla 11: TC de la onda b durante el AERG (t_0 , t_2 , t_4 , t_8 , t_{16} y t_{32}). No hubo diferencias significativas entre grupos en t_{32} .

1.1.2.2.- SINGLE FLASH (SF):

1.1.2.2.1.- AMPLITUD (μV) EN VALOR ABSOLUTO DE LA ONDA a:

La amplitud de la onda a del single flash para el grupo ISON tuvo un máximo de 261,5 y un mínimo de 191 con una media de $227,2 \pm 24,7$. En el grupo ISOH osciló entre 260 y 179 con una media de $223,8 \pm 36,1$. Para el grupo SEVON varió entre 297 y 176 con una media de $228,7 \pm 42,1$. En el grupo SEVOH tuvo un máximo de 280 y un mínimo de 267 con una media de $225,3 \pm 45$ (tabla 11).

1.1.2.2.2.- TC (ms) DE LA ONDA a:

El tiempo de culminación de la onda a en el grupo ISON osciló entre 12 y 8,5 y su media fue de $10,3 \pm 1,4$. En el grupo ISOH osciló entre 10,2 y 8,8 con una media de $9,6 \pm 0,6$. En el grupo SEVON varió entre 12,5 y 9,8 con una media de $11 \pm 1,1$. En el grupo SEVOH se movió entre un máximo de 11 y un mínimo de 8,8, su media fue de $9,9 \pm 0,7$ (tabla 11).

1.1.2.2.3.- AMPLITUD (μV) DE LA ONDA b:

Resultados

La amplitud máxima de la *onda b* en el grupo ISON fue de 507 y la mínima de 368 y la media fue de $440,3 \pm 52$. En el grupo ISOH osciló entre 405 y 346 con una media de $385,3 \pm 21,9$. Para el grupo SEVON varió entre 546 y 305 con una media de $397,3 \pm 82,4$. En el grupo SEVOH se movió entre 539 y 247 con una media de $371,2 \pm 95,2$ (**tabla 11**).

1.1.2.2.3.- TC (ms) DE LA ONDA b:

El tiempo de culminación de la *onda b* en el grupo ISON osciló 33,5 y 27,5 con una media de 31 ± 2 . Para el grupo ISOH varió entre 32,7 y 27,8 con una media de $31 \pm 1,8$. En el grupo SEVON osciló entre 33 y 29,5 con una media de $31,9 \pm 1,5$. En el grupo SEVOH el tiempo de culminación máximo fue de 32,5 y el mínimo de 28,8 con una media de $30,7 \pm 1,4$ (**tabla 11**).

1.1.2.2.4.- RELACIÓN b/a:

En el grupo ISON la relación b/a tuvo un valor máximo de 2,2 y uno mínimo de 1,6, su media fue de $1,9 \pm 0,2$. Para el grupo ISOH el máximo lo encontramos en 2,2 y el mínimo en 1,3 y la media en $1,8 \pm 0,3$. En los animales del grupo SEVON la relación b/a tuvo un máximo de 2,3 y un mínimo de 1,5, su media fue de $1,8 \pm 0,3$. Para el grupo de SEVOH osciló entre 1,4 y 2,1, su media fue de $1,7 \pm 0,3$ (**tabla 11**).

1.1.2.2.5.- COMPARATIVA DE LOS 4 GRUPOS:

No hubo diferencias significativas en la relación b/a entre los cuatro grupos (**tabla 11**).

		ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
		Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)
<i>Onda a</i>	AMPLITUD (μ v)	227,2 \pm 24,7	11	223,8 \pm 36,1	16	228,7 \pm 42,1	18	225,3 \pm 45,0	20
	TC (ms)	10,3 \pm 1,4	1	9,6 \pm 0,6	1	11,0 \pm 1,1	1	9,9 \pm 0,7	1
<i>Onda b</i>	AMPLITUD (μ v)	440,3 \pm 52,0	12	385,3 \pm 21,9	6	397,3 \pm 82,4	21	371,2 \pm 95,2	26
	TC (ms)	31,0 \pm 2,0	7	31,0 \pm 1,8	6	31,9 \pm 1,5	5	30,7 \pm 1,4	4
RELACIÓN b/a		1,9 \pm 0,2	11	1,8 \pm 0,3	19	1,8 \pm 0,3	16	1,7 \pm 0,3	17

Tabla 12: Amplitud y TC de las *ondas a* y *b*, así como la relación b/a del SF. No hubo diferencias significativas entre grupos.

1.1.3.- TERCERA PARTE; FOTÓPICA:

En esta última parte del protocolo se estudiaron 4 frecuencias temporales del flicker (6, 12, 20 y 30 Hz) en el tiempo (minutos) 0 (segundo flicker) y en el tiempo 10 (tercer flicker).

1.1.3.1.- SEGUNDO FLICKER:

1.1.3.1.1.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 6 HZ:

La amplitud máxima del flicker de 6 Hz fue de 102 y el mínimo de 75,2 con una media de $85,3 \pm 12,3$ en el grupo ISON. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 87,5 y 72 con una media de $79,3 \pm 5,7$. En el grupo SEVON los valores oscilaron entre 94 y 71 con una media de $85,9 \pm 9$. Para el grupo SEVOH los valores variaron entre 88,5 y 55, la media fue de $70,4 \pm 12,7$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.1.2.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 12 HZ:

En el grupo ISON el valor máximo fue 126 y el mínimo 81 y la media de $100,5 \pm 17,9$. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 101,5 y 79, 5 con una media de $93,8 \pm 8,1$. En el grupo SEVON los valores variaron entre 116 y 82 con una media de $100,8 \pm 13,8$. En el grupo SEVOH la amplitud máxima fue de 108 y el mínimo de 75, la media estuvo en $90,2 \pm 13$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.1.3.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 20 HZ:

En el grupo ISON el máximo se encontró en 174 y el mínimo de 105,5 y la media en $130,2 \pm 25,6$. En el grupo ISOH los valores oscilaron entre 142,7 y el mínimo de 106 con una media de $121,9 \pm 14,4$. Para el grupo SEVON los valores variaron entre 154 y 108 con una media de $130,9 \pm 17,9$. En el grupo SEVOH el máximo estuvo en 143, el mínimo en 148 y la media en $116,5 \pm 19,4$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.1.4.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 30 HZ:

En el grupo ISON la amplitud máxima de 188 y la mínima de 123 con una media de $151 \pm 21,3$. Para el grupo ISOH los valores oscilaron entre 192,3 y 118 con una media de $153,1 \pm 24,5$. En el grupo SEVON los valores variaron entre 187 y 131 con una media de $152,5 \pm 19,3$. Para el grupo

SEVON el máximo fue de 177 y el mínimo de 120, la media fue de $154,2 \pm 23,8$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.2.- TERCER FLICKER:

1.1.3.2.1.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 6 HZ:

Para el grupo ISON la amplitud máxima fue de 104 y 77 con una media de $87,4 \pm 12$. En el grupo ISOH los valores oscilaron entre 84,7 y 62 con una media de $79,6 \pm 8,7$. En el grupo SEVON los valores variaron 95 y 68 con una media de $83,2 \pm 8,9$. Para el grupo SEVOH el máximo fue de 87 y el mínimo de 61 con una media de $75,2 \pm 11,1$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.2.2.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 12 HZ:

En el grupo ISON el máximo fue de 129 y el mínimo en 81,8, la media fue de $97,4 \pm 19,7$. Para los animales del grupo ISOH encontramos un máximo de 104 y un mínimo de 79,3 con una media de $95,4 \pm 8,8$. En el grupo SEVON los valores oscilaron entre 107 y 78 con una media de $95,7 \pm 10$. En el grupo SEVOH los valores se movieron entre 96 y 70 con una media de $83,2 \pm 9,7$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.2.3.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 20 HZ:

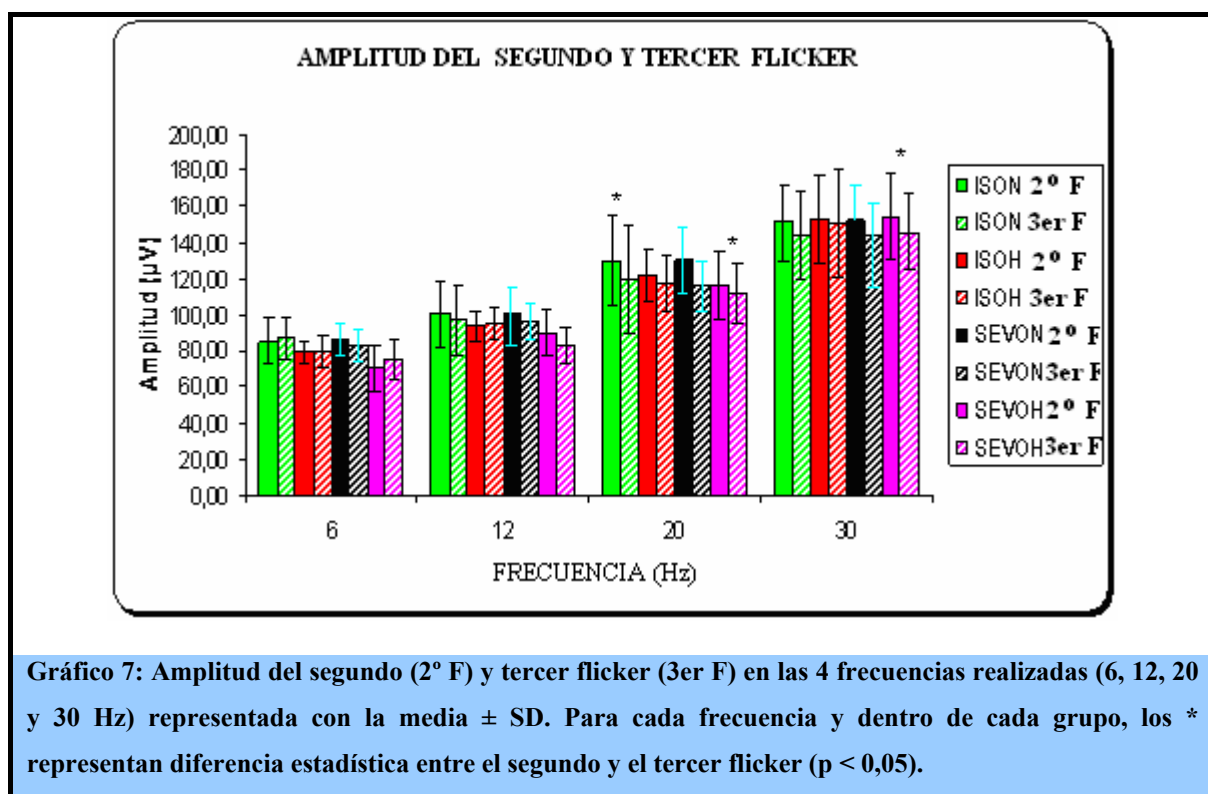
En el grupo ISON los valores oscilaron entre 170 y 94 y la media fue de $119,5 \pm 29,6$. Para el grupo ISOH la amplitud máxima se encontró en 135 y 93 con una media de $117,4 \pm 15$. En el grupo SEVON el máximo fue de 130 y el mínimo de 94 con una media de $116,3 \pm 13,8$. En el grupo SEVOH los valores se movieron entre 140 y 91,5 y la media estuvo $111,6 \pm 16,7$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.2.4.- AMPLITUD (μV) DEL FLICKER 30 HZ:

En el grupo ISON la amplitud máxima fue de 190 y la mínima de 121,5 con una media de $144,2 \pm 24,4$. En el grupo ISOH los valores se movieron entre 195 y 103 con una media de $150,7 \pm 29,5$. Para el grupo SEVON los valores oscilaron entre 175 y 127 y con una media de $144,7 \pm 16,7$. En el grupo SEVOH se encontró una amplitud máxima de 170 y una mínima de 119 con una media de $145,8 \pm 21$ (**gráfico 7 y tabla 12**).

1.1.3.2.5.- COMPARATIVA ENTRE LA AMPLITUD DEL SEGUNDO Y TERCER FLICKER EN LOS 4 GRUPOS:

No hubo diferencias significativas entre el segundo y tercer flicker de 6 y de 12 Hz en ninguno de los grupos. En el flicker de 20 Hz, el tercer flicker fue significativamente menor que el segundo en los grupos ISON y SEVON, en el resto de grupos no hubo diferencias. En el flicker de 30 Hz el tercer flicker fue significativamente menor que el segundo en el grupo SEVOH, en el resto de grupos no hubo diferencias (gráfico 7 y tabla 12).



	ISON		ISOH		SEVON		SEVOH	
	2° F	3er F	2° F	3er F	2° F	3er F	2° F	3er F
6 Hz	85,3±12,3	87,4±12,0	79,3±5,7	79,6±8,7	85,9±9,0	83,2±8,9	70,4±12,7	75,2±11,1
12 Hz	100,5±17,9	97,4±19,7	93,8±8,1	95,4±8,8	100,8±13,8	95,7±10,0	90,2±13,0	83,2±9,7
20 Hz	130,2±25,6	119,5±29,6 *	121,9±14,4	117,4±15,0	130,9±17,9	116,3±13,8	116,5±19,4	111,6±16,7 *
30 Hz	151,0±21,3	144,2±24,4	153,1±24,5	150,7±29,5	152,5±19,3	144,7±16,7	154,2±23,8	145,8±21 *

Tabla 13: Amplitud del segundo (2° F) y tercer flicker (3er F) en las 4 frecuencias realizadas (6, 12, 20 y 30 Hz) representada con la media \pm SD. Para cada frecuencia y dentro de cada grupo, los * representan diferencia estadística entre el segundo y el tercer flicker ($p < 0,05$).

1.2.- ANÁLISIS CUALITATIVO:

1.2.1.- ONDA a:

La *onda a* fue registrable en todos los grupos hasta intensidades de $-2,19 \text{ cd.s.m}^{-2}$. Para intensidades de estímulo inferiores a estas no se registró *onda a* en ninguno de los 4 grupos estudiados (**figuras 74-77**). La *onda a* mostró amplitudes similares en todos los grupos a todas las intensidades de estímulo estudiadas. No obstante cuanto mayor intenso fue el estímulo más diferentes fueron las amplitudes de la *onda a* entre los grupos hipercápnicos con respecto a los normocápnicos (con estímulos intensos la amplitud tendió a ser menor en los grupos hipercápnicos) (**figuras 74-77, y gráfico 8**). El TC se fue alargando a medida que disminuyó la intensidad del estímulo, comenzando en unos 8 ms con el estímulo más intenso utilizado y terminando en unos 16 ms con el estímulo más débil al cual se registró (**gráfico 9**).

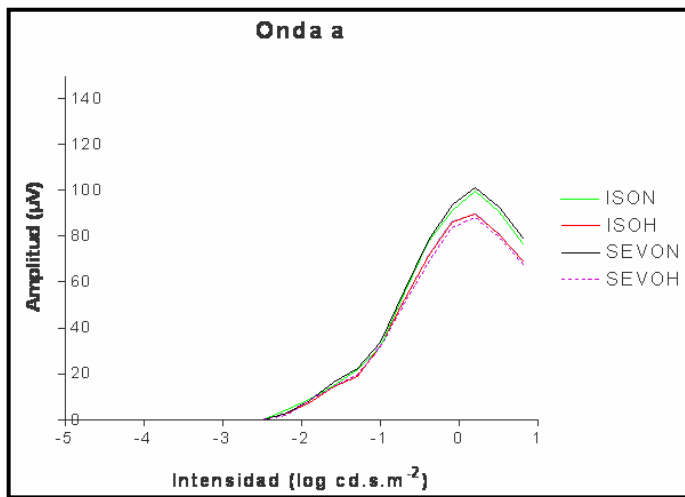


Gráfico 8: Amplitud de la *onda a* durante el “photopic hill”. Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD (ver figuras 74-77) para facilitar la visualización de las curvas.

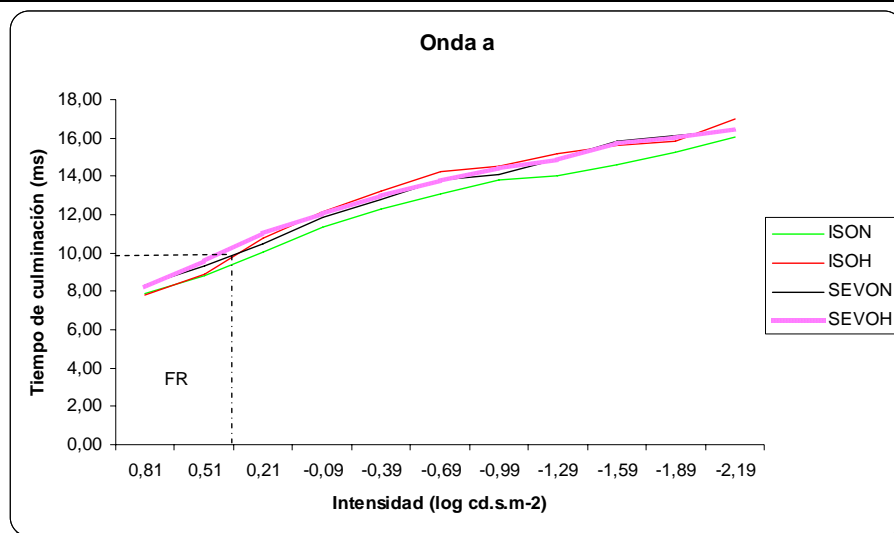


Gráfico 9: TC de la *onda a* durante el “photopic hill”. Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD para facilitar la visualización de las curvas. La línea punteada representa la intensidad de estímulo necesaria para la cual la amplitud de la *onda a* fue de 10 ms.

1.2.2.- ONDA b:

La *onda b* desapareció a partir de intensidades de estímulo de -2,79 o de -3,09 cd.s.m^{-2} en los animales de los grupos ISOH y SEVOH (**figuras 75 y 77, y gráfico 10**). En los grupos ISON y SEVON la *onda b* desapareció a intensidades de -3,09 o 3,39 cd.s.m^{-2} e inferiores (**figuras 74 y 77, y gráfico 10**). La *onda b* fue menor en todas las intensidades estudiadas para los grupos ISOH y SEVOH, que para los grupos ISON y SEVON (**gráfico 10**). A nivel individual, en todos los perros de los distintos grupos, la intensidad que dio lugar al Vmax, es decir Imax, se situó entre 0,51 y –

Resultados

0,39 log cd.s.m⁻² (figuras 74-77, y gráfico 10), lo cual se corresponde a la intensidad de estímulo fruto de intercalar al flash del fotoestimulador filtros atenuadores de entre 0,3 y 1,2 log. De media, en todos los grupos el I_{max} osciló entre 0,06 y -0,19 log cd.s.m⁻² (tabla 3). En nuestro experimento la intensidad más cercana a ese rango se correspondió con -0,09 log cd.s.m⁻², fruto de intercalar un filtro atenuador de 0,9 log.

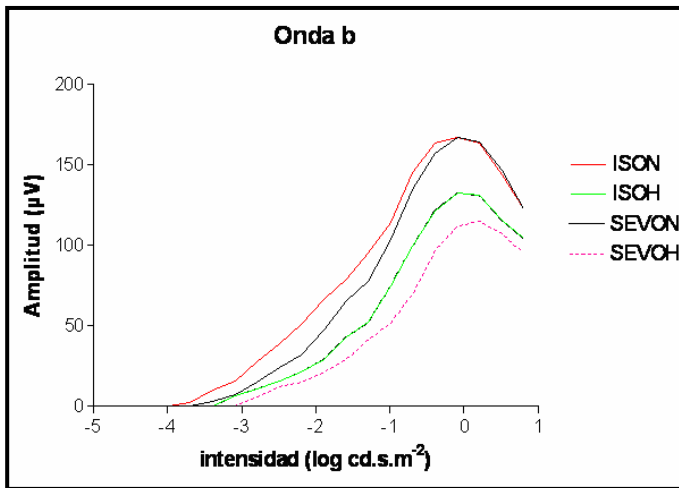


Gráfico 10: Amplitud de la *onda b* durante el “photopic hill”. Los valores se representan solamente con la media, omitiendo las barras de SD (ver figuras 74-77) para facilitar la visualización de las curvas.

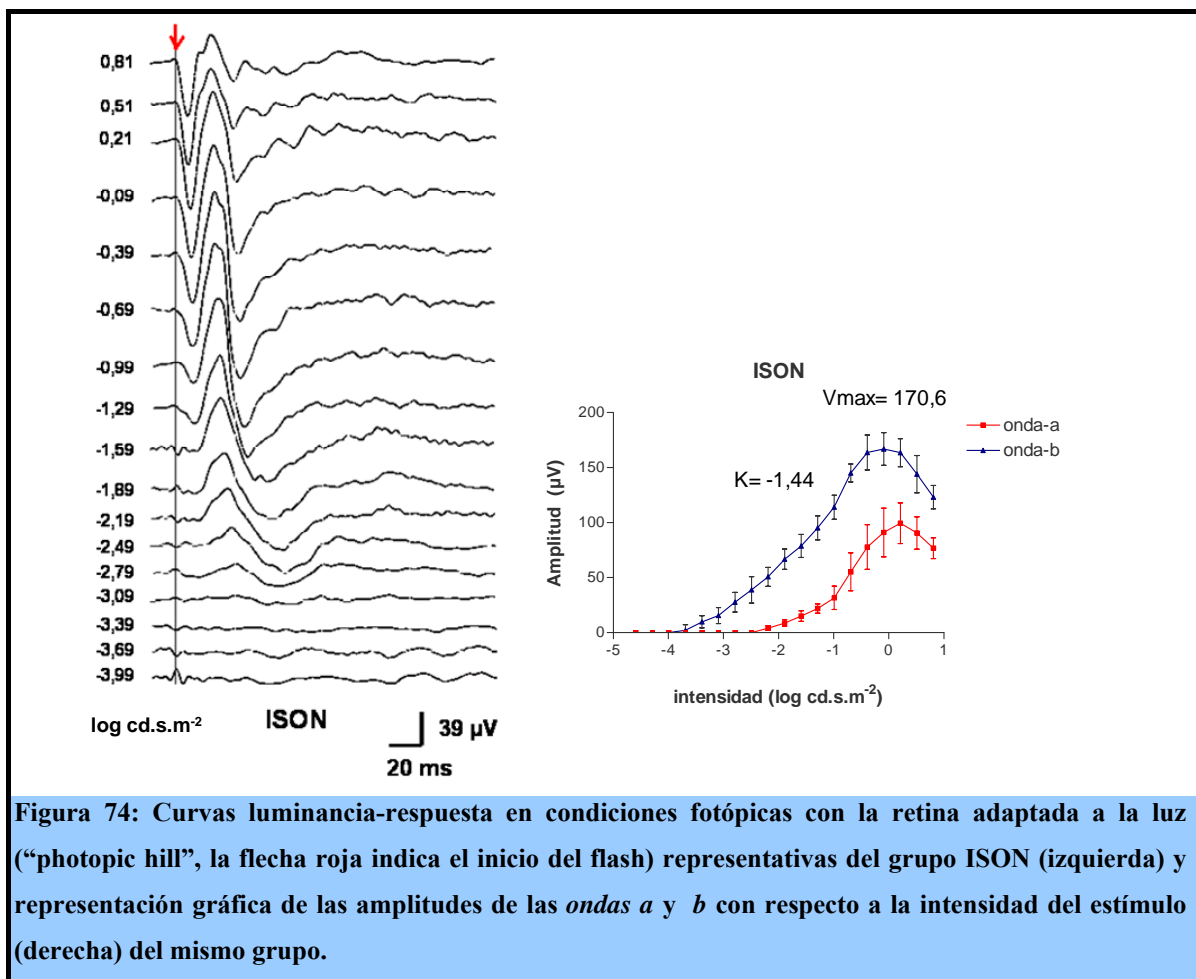


Figura 74: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo ISON (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las *ondas a* y *b* con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo.

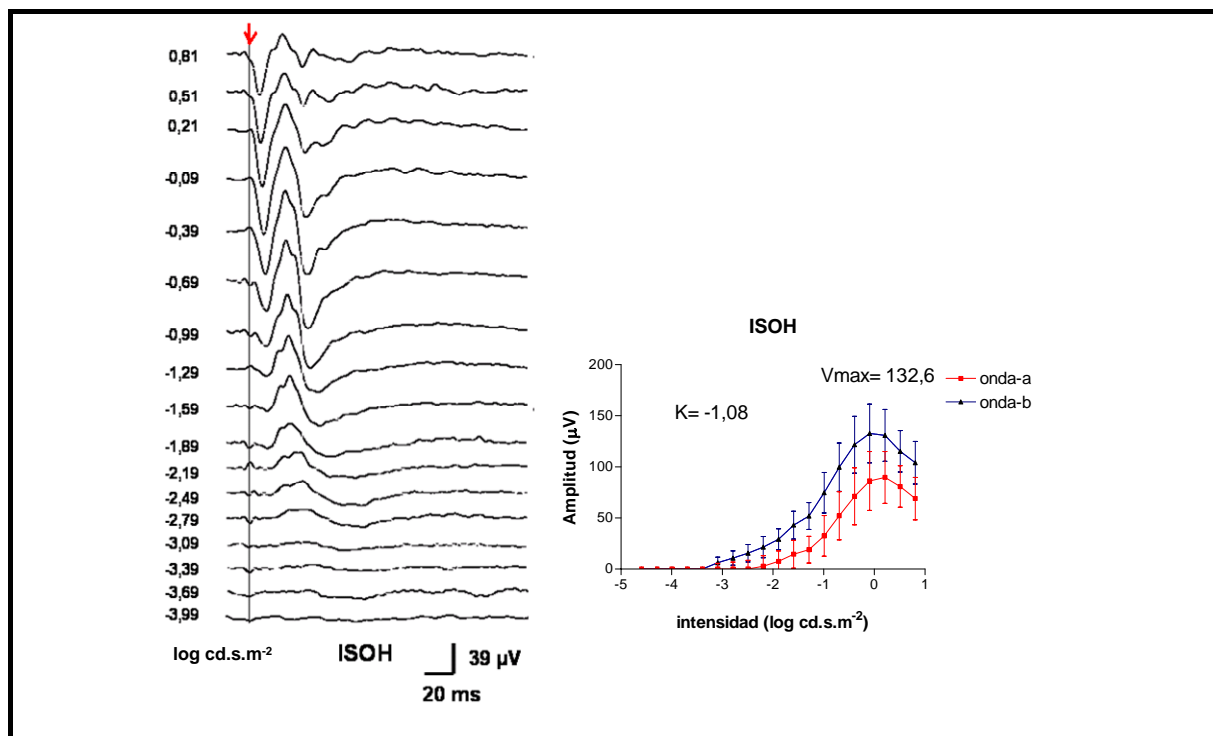


Figura 75: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo ISOH (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas *a* y *b* con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo.

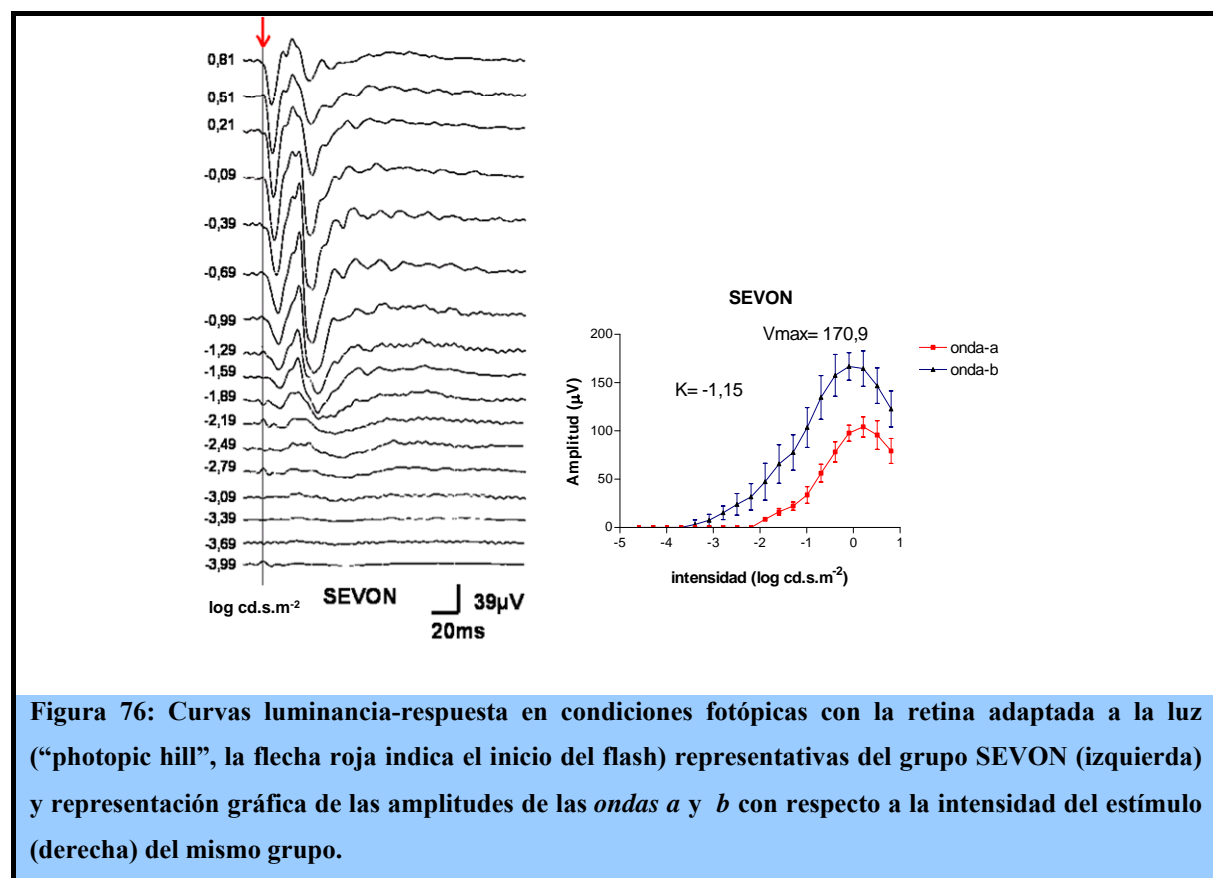


Figura 76: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo SEVON (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas *a* y *b* con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo.

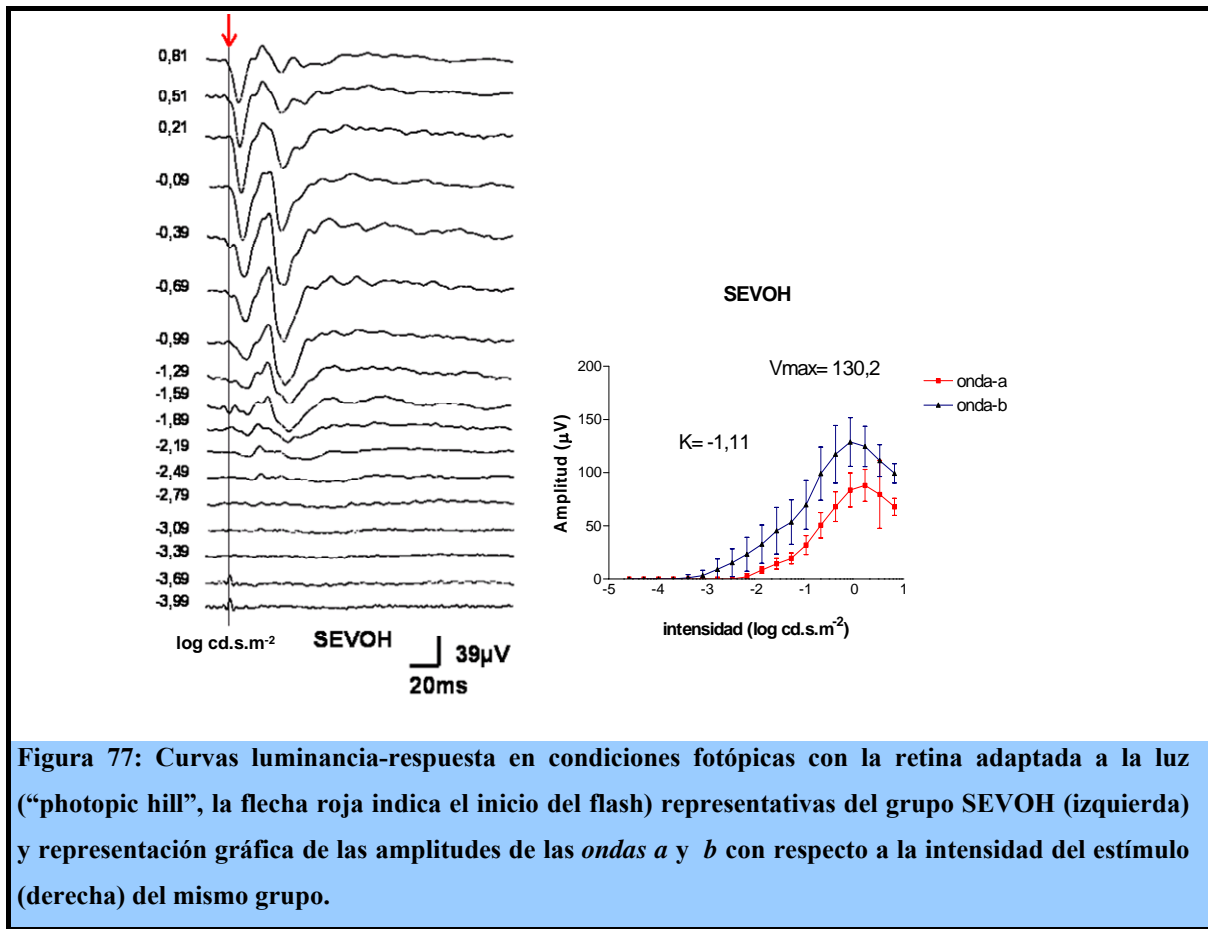


Figura 77: Curvas luminancia-respuesta en condiciones fotópicas con la retina adaptada a la luz (“photopic hill”, la flecha roja indica el inicio del flash) representativas del grupo SEVOH (izquierda) y representación gráfica de las amplitudes de las ondas *a* y *b* con respecto a la intensidad del estímulo (derecha) del mismo grupo.

1.2.3.- ONDA *i*:

En todos los grupos la *onda i* (figura 78) cuando se evidenció con claridad entorno a los 50 ms, lo hizo en las dos intensidades máximas estudiadas (0,81 y 0,51 cd.s.m⁻²), fue difícilmente apreciable en la siguiente intensidad (0,21 cd.s.m⁻²) y no se detectó con intensidades de estímulo inferiores (figuras 74-77).

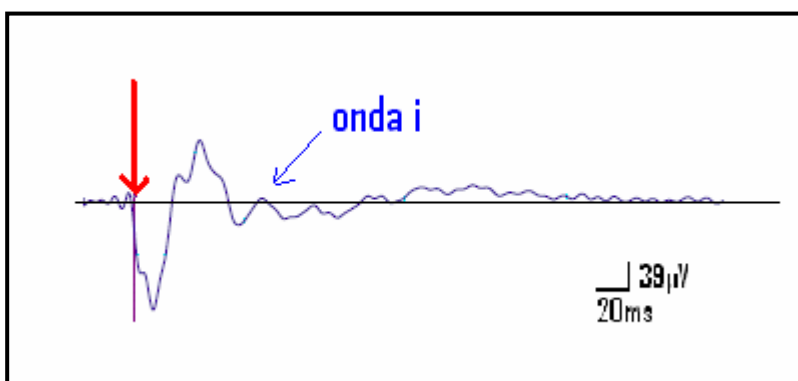


Figura 78: ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de la *onda i*, en nuestro experimento. La flecha roja indica el inicio del flash.

1.2.4.- OPs:

Los 3 OPs medidos (OP2, OP3 y OP4) fueron de pequeña amplitud en todos los animales y presentaron una gran variabilidad en cuanto a su amplitud en todos los grupos estudiados. El OP3 siempre fue el mayor de los 3 (**figura 79 y tabla 6**).

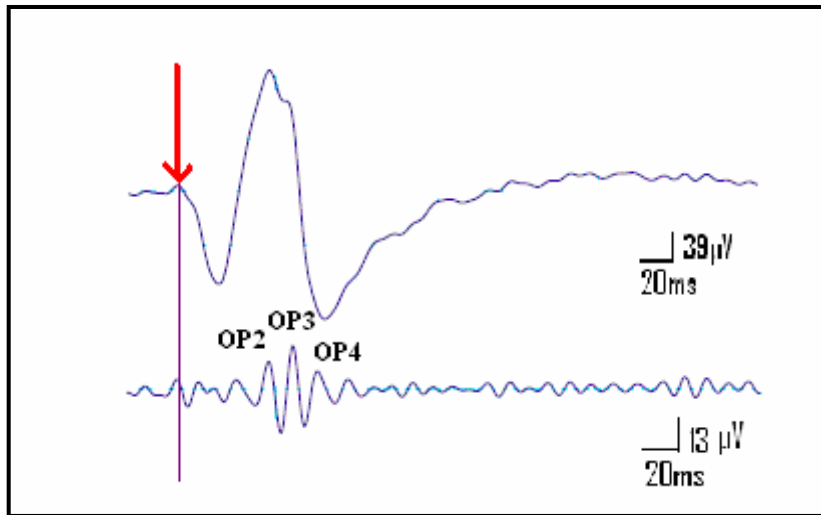


Figura 79: ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de los OPs de nuestro experimento (trazado inferior) tras ser extraídos de la curva original (trazado superior), la flecha roja indica el inicio del flash.

1.2.5.- RESPUESTA NEGATIVA TRAS LA ONDA *b* (PhNR):

En todos los grupos la deflexión negativa posterior a la *onda b* (**figura 80**) fue máxima en intensidades de estímulo -0.39 o de -0,69 log cd.s.m⁻² (**figuras 74-77**).

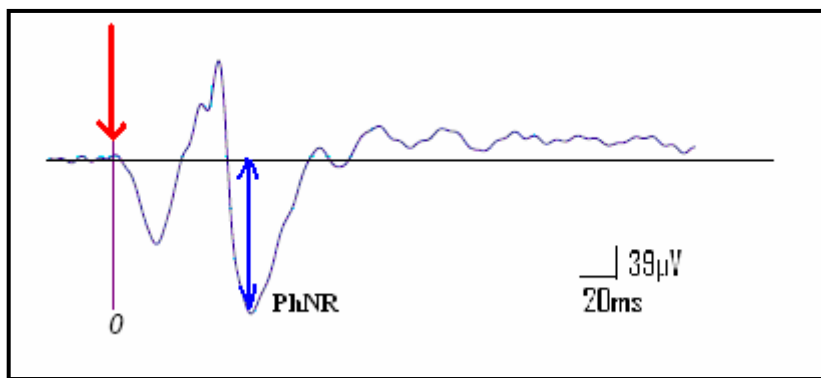


Figura 80: ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de la PhNR, en nuestro experimento. La flecha roja indica el inicio del flash.

1.2.6.- FLICKER:

La amplitud del flicker aumentó para todos los animales con la frecuencia, es decir el flicker de 30 Hz siempre tuvo mayor amplitud que el de 6 Hz (**gráficos 4 y 8, y tablas 8 y 12**). Asimismo su

morfología fue distinta según la frecuencia; en el flicker de 30 Hz tiene una forma claramente sinusoidal en la que solo se aprecian picos (**figura 81**).

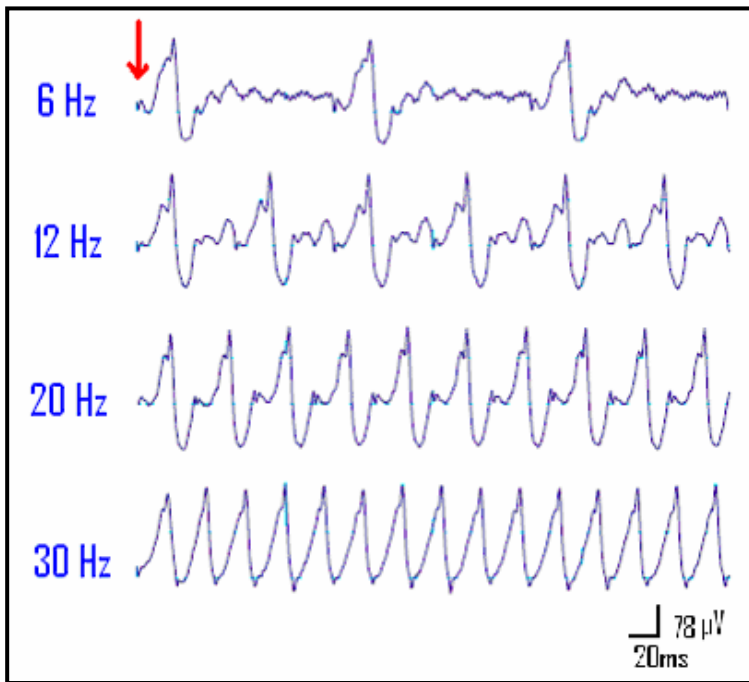


Figura 81: Flicker ERG fotópico representativo, en el que se aprecia la morfología de las ondas para cada una de las frecuencias estudiadas en nuestro experimento, la flecha roja indica el inicio del flash.

1.2.7.- ADAPTO-ELECTRORRETINOGRAMA (AERG):

Uno de los animales mostró una débil adaptación a la oscuridad. En algunos animales apareció en su ERG una pequeña *onda a*, a partir de T16 o en T32 (**figura 82**). Cuando aparecía dicha *onda a* presentaba un tiempo de culminación mucho mayor al de la *onda a* de los ERGs fotópicos (**figuras 74-77, y gráfico 9**) y del single flash (**figura 85**). La amplitud de la *onda b* del AERG fue menor en todos los tiempos para los grupos hipercápnicos (**figuras 82 y 83, gráfico 6 y tabla 9**).

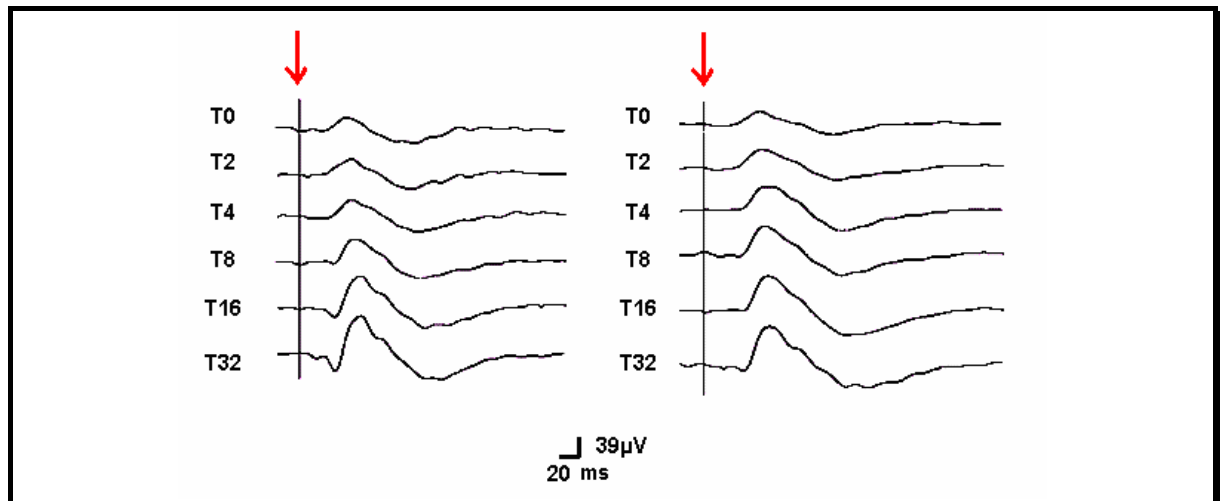


Figura 82: AERG representativo de los grupos normocápnicos (ISON y SEVON) de nuestro experimento, en el que se aprecia la morfología del ERG escotópico durante 32 minutos de adaptación a la oscuridad. En algún animal apareció una pequeña *onda a* en el minuto 32 y/o 16 (izquierda). La flecha roja indica el inicio del flash.

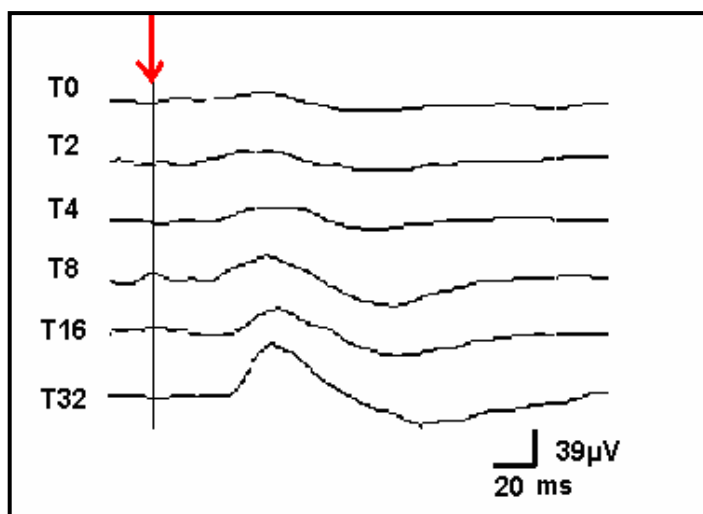


Figura 83: AERG representativo de los grupos hipercápnicos (ISOH y SEVOH) de nuestro experimento, en el que se aprecia la morfología del ERG escotópico durante 32 minutos de adaptación a la oscuridad. La flecha roja indica el inicio del flash.

En todos los grupos, el AERG mostró una respuesta negativa tras la *onda b*. Dicha respuesta negativa se presentó en todos los tiempos pero fue mayor y más tardía en T32. Esta negatividad fue mucho más tardía que la registrada en condiciones fotópicas (PhNR), ya que apareció entorno a los 100 ms (**figura 84**).

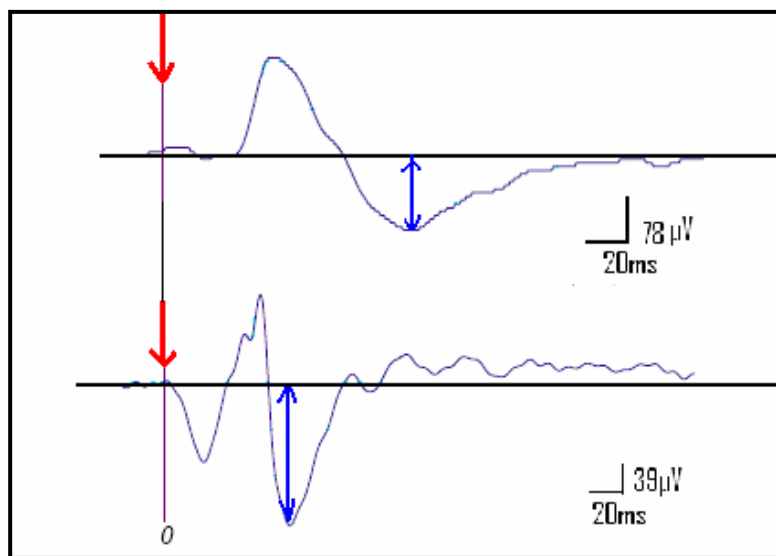


Figura 84: ERG fotópico representativo de nuestro experimento, en el que se aprecia la morfología de la PhNR, (trazado inferior). ERG escotópico en T32 del AERG en el que se aprecia una negatividad posterior a la onda *b*, más tardía que la PhNR (trazado superior). La flecha roja indica el inicio del flash.

1.2.8.- SINGLE FLASH (SF):

El SF mostró una gran amplitud en todos los animales y en todos los grupos. El ERG evocado por un único flash mostró un trazado bastante contaminado (figura 85).

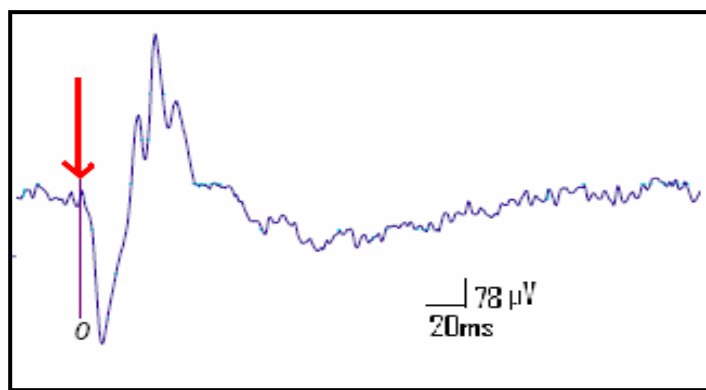


Figura 85: SF representativo de nuestro experimento. La flecha roja indica el inicio del flash.

2.- DILATACIÓN PUPILAR:

2.1.- DIÁMETRO PUPILAR (mm) AL INICIO:

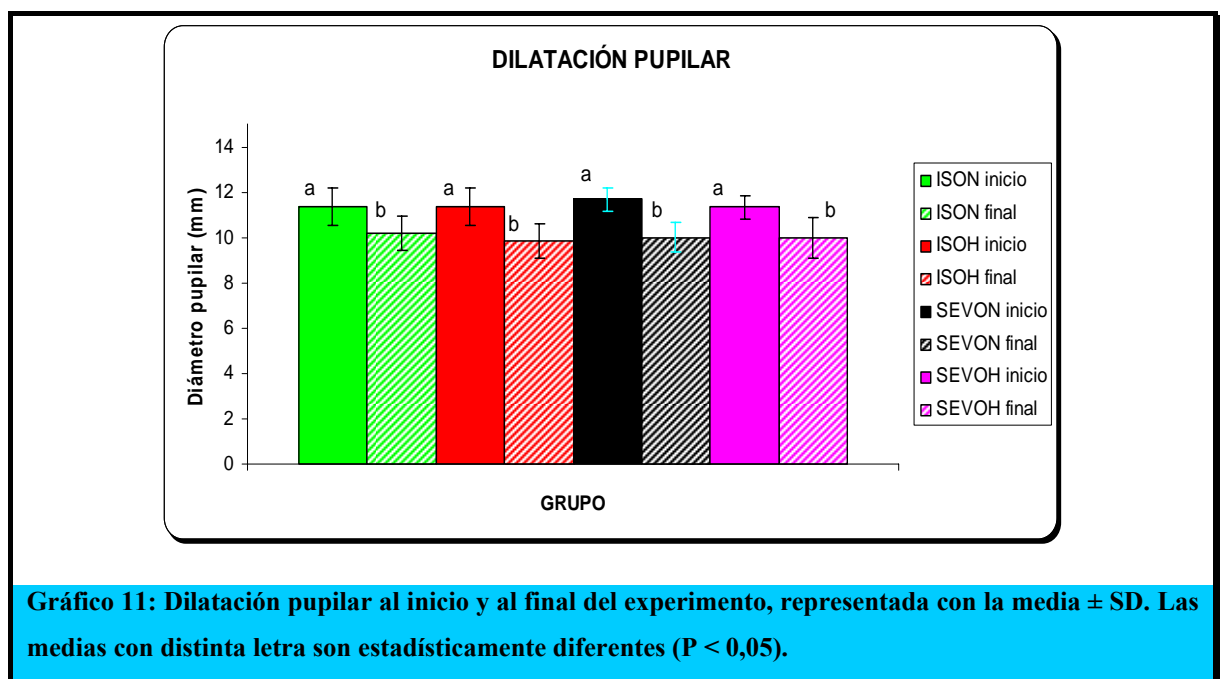
El diámetro pupilar al inicio del experimento de los animales dentro del grupo ISON y del grupo ISOH varió entre 12 y 10 y su media fue de $11,3 \pm 0,8$. Para el grupo SEVON los valores oscilaron entre 12 y 11 con una media de $11,7 \pm 0,5$. En el grupo SEVOH encontramos un valor máximo de 12, uno mínimo de 11 y una media de $11,3 \pm 0,5$ (gráfico 11 y tabla 13).

2.2.- DIÁMETRO PUPILAR (mm) AL FINAL:

El diámetro pupilar al final del experimento de los animales dentro del grupo ISON varió entre 11 y 9 y su media fue de $10,2 \pm 0,8$. Para el grupo ISON los valores oscilaron entre 11 y 9 con una media de $9,8 \pm 0,8$. En el grupo SEVON encontramos un valor máximo de 11, uno mínimo de 9 y una media de $10 \pm 0,6$. En el grupo SEVOH los valores oscilaron entre 9 y 11 con una media de $10 \pm 0,9$ (gráfico 11 y tabla 13).

2.3.- DIFERENCIAS ENTRE LOS 4 GRUPOS:

No hubo diferencias significativas en los diámetros pupilares al inicio del experimento entre los cuatro grupos. Tampoco hubo diferencias significativas en los diámetros pupilares de los cuatro grupos al final del experimento. El diámetro pupilar disminuyó significativamente al final del experimento en todos los grupos con respecto al diámetro pupilar del inicio del experimento (gráfico 11 y tabla 13).



DIÁMETRO PUPILAR (mm)	ISON	ISOH	SEVON	SEVOH
INICIO	11,3±0,8 a	11,3±0,8 a	11,6±0,5 a	11,3±0,5 a
FINAL	10,2±0,8 b	9,8±0,8 b	10±0,6 b	10±0,9 b

Tabla 14: Dilatación pupilar al inicio y al final del experimento, representada con la media \pm SD. Las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

3.- RESULTADOS ANESTÉSICOS:

Hemos medido los parámetros cardiovasculares (PAM y FC), la temperatura y el tiempo de recuperación anestésica. Ciertos parámetros respiratorios como la frecuencia respiratoria y la $FEFCO_2$, así como la fracción espiratoria de anestésico inhalatorio, fueron controlados formando parte del diseño experimental. La fracción inspiratoria de O_2 fue de $75 \pm 3 \%$ en todos los grupos y la saturación parcial de O_2 de $98 \pm 1 \%$.

3.1.- PARÁMETROS CARDIOVASCULARES Y TEMPERATURA:

3.1.1.- PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (mmHg) (PAM):

3.1.1.1.- ISON:

La PAM tuvo un valor máximo de 97 ± 7 en el tiempo 0, y un valor mínimo de 61 ± 5 en el minuto 10. La PAM mostró un descenso significativo des el minuto 5 hasta el minuto 60 (**gráfico 12 y tabla 14**).

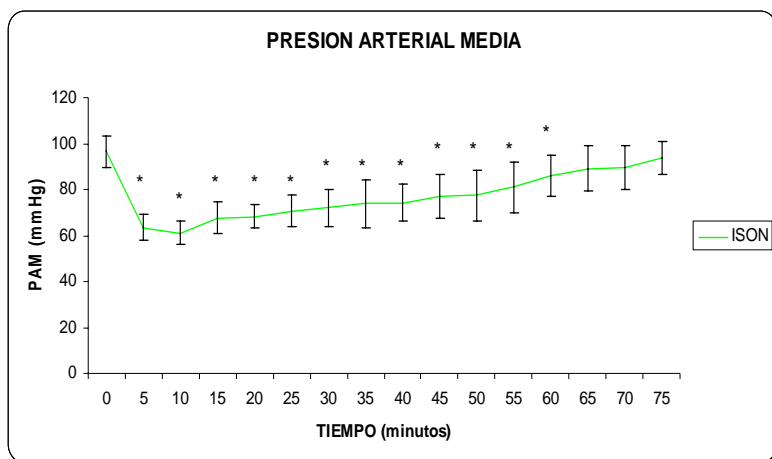


Gráfico 12: PAM del grupo ISON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.1.2.- ISOH:

La PAM tuvo un valor máximo de 98 ± 8 en el tiempo 0 y un valor mínimo de 68 en el tiempo 10 ± 13 . La PAM sufrió un descenso significativo desde el minuto 5 hasta el minuto 60 (gráfico 13 y tabla 14).

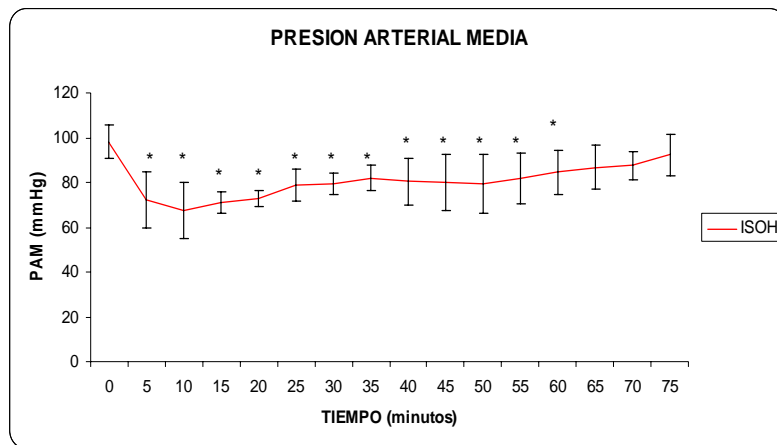


Gráfico 13: PAM del grupo ISOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.1.3.- SEVON:

La PAM tuvo un valor máximo de 99 ± 3 en el tiempo 0 y un valor mínimo de 63 ± 6 en el minuto 5. La PAM mostró un descenso significativo desde el minuto 5 hasta el minuto 55 (gráfico 14 y tabla 14).

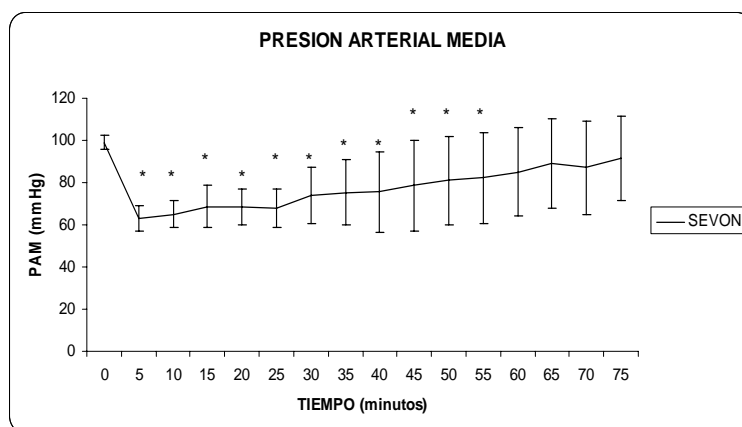


Gráfico 14: PAM del grupo SEVON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.1.4.- SEVOH:

La PAM tuvo un valor máximo de 106 ± 4 en el tiempo 0 y un valor mínimo de 66 ± 7 en el tiempo 10. La PAM descendió significativamente desde el minuto 5 hasta el minuto 55 (gráfico 15 y tabla 14).

Resultados

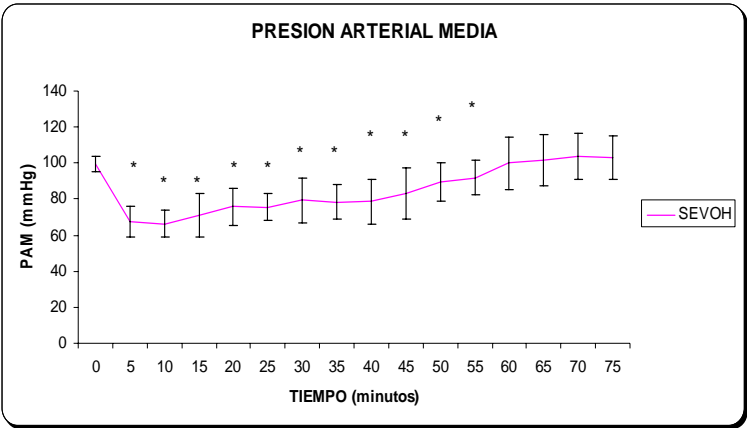


Gráfico 15: PAM del grupo SEVOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.2.- FRECUENCIA CARDÍACA EN (latidos/minuto) (FC):

3.1.2.1.- ISON:

La FC máxima fue de 114 ± 14 en el minuto 5 y la mínima fue de 83 ± 8 en el minuto 0. Hubo un aumento significativo de la FC desde el minuto 5 y hasta el final del experimento (gráfico 16 y tabla 15).

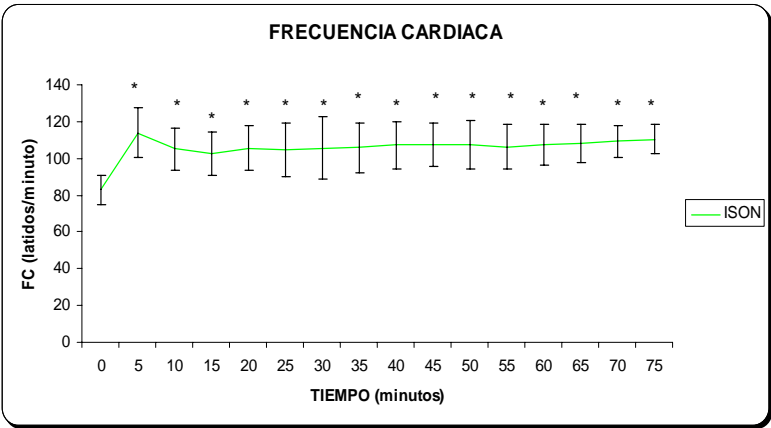


Gráfico 16: FC del grupo ISON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.2.2.- ISOH:

La FC tuvo un valor máximo en 127 ± 11 en el minuto 5 y un valor mínimo de 86 ± 8 en el tiempo 0. Hubo un aumento significativo desde el minuto 5 hasta el final de las mediciones (gráfico 17 y tabla 15).

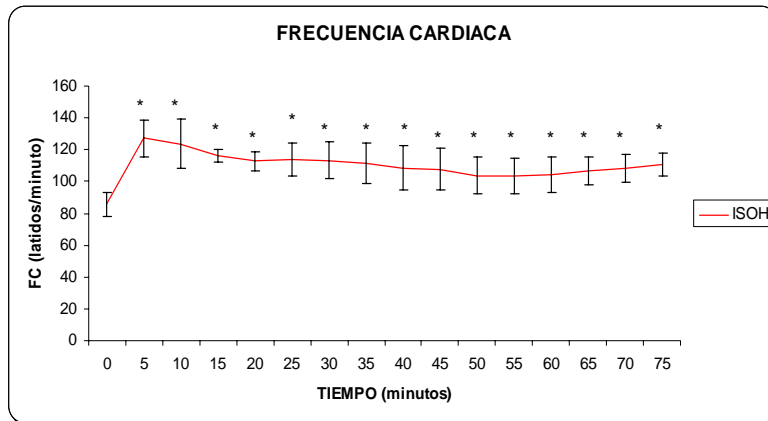


Gráfico 17: FC del grupo ISOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.2.3.- SEVON:

La FC fue máxima en el minuto 5 con un valor de 122 ± 13 , y tuvo un valor mínimo de 89 ± 7 en el tiempo 0. Hubo un aumento significativo desde el minuto 5 hasta el final del experimento (gráfico 18 y tabla 15).

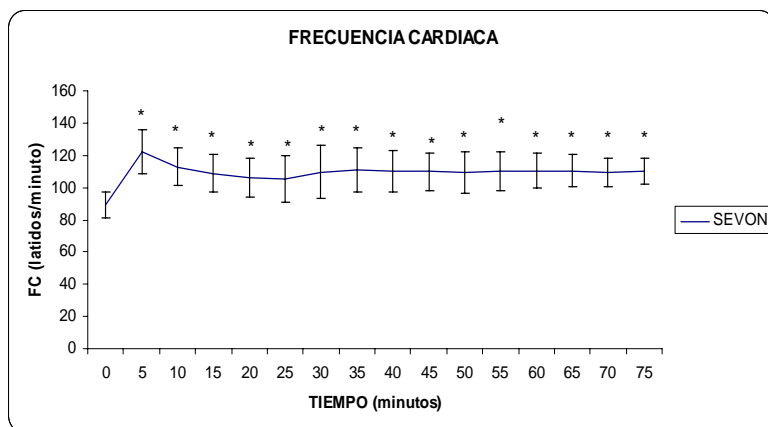


Gráfico 18: FC del grupo SEVON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.2.4.- SEVOH:

La FC fue máxima en el minuto 5 con un valor de 125 ± 10 y minuto 0 con un valor de 86 ± 8 . La FC mostró un descenso significativo desde el minuto 5 que se mantuvo hasta el final (gráfico 19 y tabla 15).

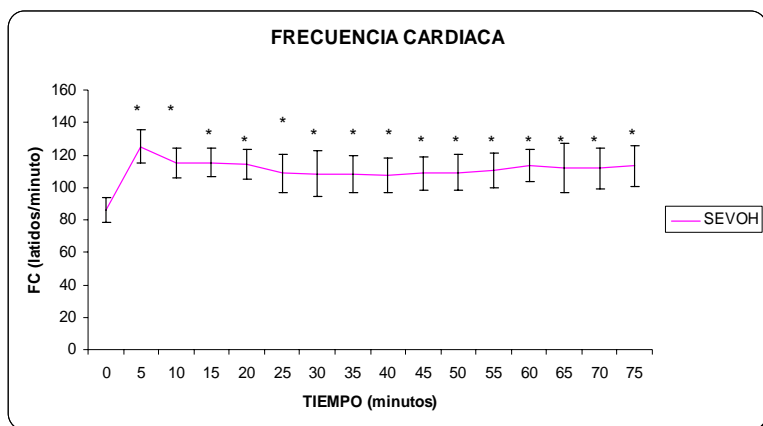


Gráfico 19: FC del grupo SEVOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.3.- TEMPERATURA (C°) (T^a):

3.1.3.1.- ISON:

La T^a osciló entre un valor máximo de $38,3 \pm 0,2$ en el tiempo 0 y un valor mínimo de $36,1 \pm 0,6$ en el minuto 75. La T^a fue significativamente menor desde el minuto 20 y fue disminuyendo paulatinamente hasta el final del experimento. La pérdida media de T^a desde el inicio hasta el final del experimento fue de $2,2$ C° (gráfico 20 y tabla 16).

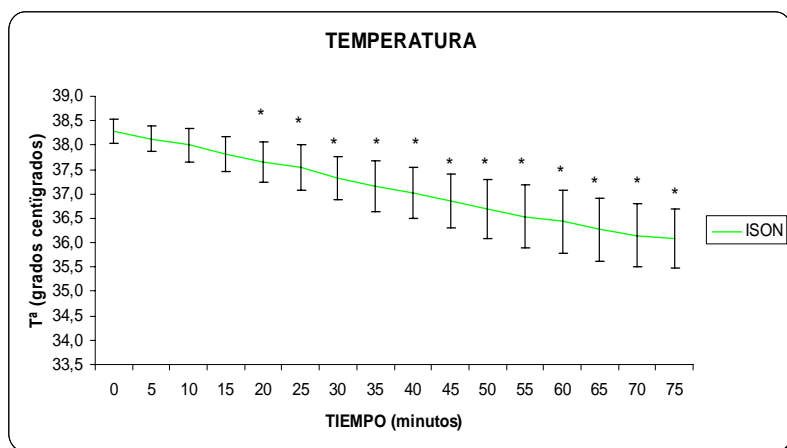


Gráfico 20: Tª del grupo ISON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.3.2.- ISOH:

La T^a osciló entre un valor máximo en el tiempo 0 de $38,3 \pm 0,1$ y un mínimo de $36,3 \pm 0,4$ en el minuto 75. La T^a fue significativamente menor desde el minuto 10 y fue disminuyendo paulatinamente hasta el minuto 75. La pérdida media de T^a desde el inicio hasta el final del experimento fue de 2 C° (gráfico 21 y tabla 16).

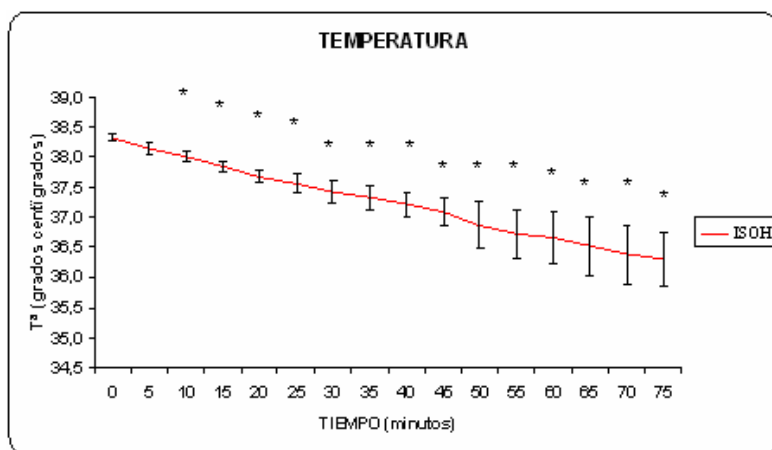


Gráfico 21: Tª del grupo ISOH. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.3.3.- SEVON:

La Tª osciló entre un valor máximo en el tiempo 0 de $38,4 \pm 0,2$ y un mínimo de $36,3 \pm 0,7$ en el minuto 75. La Tª fue significativamente menor desde el minuto 15 y fue disminuyendo paulatinamente hasta el minuto 75. La pérdida media de Tª desde el inicio hasta el final del experimento fue de $2,1^\circ\text{C}$ (gráfico 22 y tabla 16).

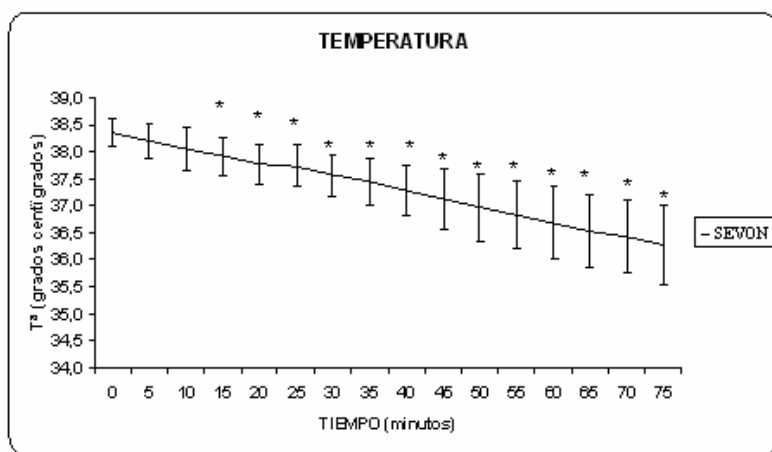


Gráfico 22: Tª del grupo SEVON. Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.3.4.- SEVOH:

La Tª osciló entre un valor máximo en el tiempo 0 de $38,3 \pm 0,3$ y un mínimo de $36,2 \pm 0,4$ en el minuto 75. La Tª fue significativamente menor desde el minuto 10 y fue disminuyendo paulatinamente hasta el minuto 75. La pérdida media de Tª desde el inicio hasta el final del experimento fue de $2,1^\circ\text{C}$ (gráfico 23 y tabla 16).

Resultados

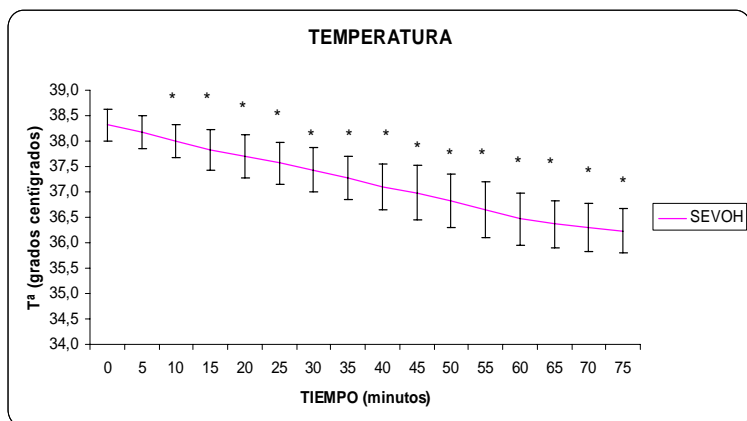


Gráfico 23: Tª del grupo SEVOH.
Los valores se representan con su media \pm SD. Los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0).

3.1.4.- COMPARATIVA DE LOS CUATRO GRUPOS:

Entre los cuatro grupos no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos (PAM, FC y Tª) (tablas 14, 15 y 16).

Tabla 15: PAM. Los valores se representan con su media \pm SD. Para un mismo grupo los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos.

GRUPO	ISON	ISOH	SEVON	SEVOH
TIEMPO (min)	mmHg	mmHg	mmHg	mmHg
BASAL	97\pm7	98\pm8	99\pm3	99\pm4
5	64 \pm 6 *	72 \pm 12 *	63 \pm 6 *	68 \pm 8 *
10	61 \pm 5 *	68 \pm 13 *	65 \pm 6 *	66 \pm 7 *
15	68 \pm 7 *	71 \pm 5 *	69 \pm 10 *	71 \pm 12 *
20	68 \pm 5 *	73 \pm 4 *	69 \pm 9 *	76 \pm 10 *
25	71 \pm 7 *	79 \pm 7 *	68 \pm 9 *	76 \pm 7 *
30	72 \pm 8 *	79 \pm 5 *	74 \pm 14 *	79 \pm 12 *
35	74 \pm 11 *	82 \pm 6 *	75 \pm 15 *	79 \pm 10 *
40	74 \pm 8 *	80 \pm 10 *	76 \pm 19 *	79 \pm 12 *
45	77 \pm 10 *	80 \pm 13 *	79 \pm 22 *	83 \pm 14 *

50	77±11 *	80±13 *	81±21 *	89±11 *
55	81±11 *	82±11 *	82±22 *	92±10 *
60	86±9 *	85±10 *	85±21	100±14
65	89±10	87±10	89±21	102±14
70	90±9	88±6	87±22	104±13
75	94±7	93±9	91±20	103±12

Tabla 16: PAM. Los valores se representan con su media \pm SD. Para un mismo grupo los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos.

TIEMPO(min)	GRUPO	ISON	ISOH	SEVON	SEVOH
		latidos/minuto	latidos/minuto	latidos/minuto	latidos/minuto
BASAL		83±8	86±8	89±7	86±8
5		114±14 *	127±11 *	122±13 *	125±10 *
10		105±11 *	124±16 *	113±6 *	115±9 *
15		103±12 *	116±4 *	109±11 *	115±9 *
20		106±12 *	113±6 *	106±12 *	114±9 *
25		105±14 *	114±10 *	106±11 *	109±12 *
30		106±17 *	113±12 *	110±12 *	109±14 *
35		106±13 *	111±13 *	111±13 *	108±11 *
40		107±13 *	109±14 *	110±14 *	107±11 *
45		108±12 *	108±13 *	110±17 *	109±10 *
50		108±13 *	104±12 *	109±16 *	109±11 *
55		106±12 *	104±11 *	111±15 *	111±11 *
60		108±11 *	104±11 *	111±14 *	114±10 *
65		108±10 *	107±9 *	110±14 *	112±15 *
70		109±9 *	109±9 *	110±13 *	112±13 *
75		110±8 *	111±7 *	110±13 *	113±13 *

Tabla 17: FC. Los valores se representan con su media \pm SD. Para un mismo grupo, los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos.

GRUPO TIEMPO(min)	ISON	ISOH	SEVON	SEVOH
	°C	°C	°C	°C
BASAL	38,3±0,2	38,3±0,1	38,4±0,2	38,3±0,3
5	38,1±0,3	38,2±0,1	38,2±0,3	38,2±0,3
10	38,0±0,4	38,0±0,1 *	38,1±0,4	38,0±0,3 *
15	37,8±0,4	37,9±0,1 *	37,9±0,4 *	37,8±0,4 *
20	37,7±0,4 *	37,7±0,1*	37,8±0,4 *	37,7±0,4 *
25	37,5±0,5 *	37,6±0,2*	37,7±0,4 *	37,6±0,4 *
30	37,3±0,4 *	37,4±0,2*	37,6±0,4 *	37,4±0,4 *
35	37,2±0,5 *	37,3±0,2*	37,5±0,4 *	37,3±0,4 *
40	37,0±0,5 *	37,2±0,2*	37,3±0,5 *	37,1±0,5 *
45	36,9±0,6 *	37,1±0,2*	37,1±0,6 *	37,0±0,5 *
50	36,7±0,6 *	36,9±0,4*	37,0±0,6 *	36,8±0,5 *
55	36,5±0,7 *	36,7±0,4*	36,8±0,6 *	36,7±0,5 *
60	36,4±0,6 *	36,7±0,4*	36,7±0,7 *	36,5±0,5 *
65	36,3±0,7 *	36,5±0,5*	36,5±0,7 *	36,4±0,5 *
70	36,2±0,6 *	36,4±0,5*	36,4±0,7 *	36,3±0,5 *
75	36,1±0,6 *	36,3±0,5*	36,2±0,8 *	36,2±0,3 *

Tabla 18: Tª. Los valores se representan con su media ± SD. Para un mismo grupo, los * indican diferencia estadística de las medias con respecto al valor basal (minuto 0). No hubo diferencias significativas entre grupos.

3.5.- TIEMPO DE RECUPERACIÓN EN MINUTOS:

3.5.1.- TIEMPO DE EXTUBACIÓN:

El tiempo medio de extubación fue de $9,5 \pm 2,4$ en el grupo ISON, de $12,5 \pm 2,9$ para el grupo ISOH, de $11,8 \pm 2,9$ en el grupo SEVON y de $13,8 \pm 1$ en el grupo SEVOH (tabla 17).

3.5.2.- TIEMPO DE POSICIÓN EN DECÚBITO ESTERNAL:

El tiempo que tardaron los animales en colocarse en decúbito esternal tuvo una media de $2,7 \pm 0,8$, $3,3 \pm 1,6$, $2,7 \pm 1$ y $4,7 \pm 1,8$ para los grupos ISON, ISOH, SEVON y SEVOH respectivamente (**tabla 17**).

3.5.3.- TIEMPO DE DEAMBULACIÓN:

El tiempo que tardaron los animales en deambular tuvo una media de $3,2 \pm 1,3$, $3,8 \pm 1,3$, $1,7 \pm 0,5$, $1,7 \pm 0,8$ para los grupos ISON, ISOH, SEVON y SEVOH respectivamente (**tabla 17**).

3.5.4.- TIEMPO TOTAL DE RECUPERACIÓN:

El tiempo total de recuperación anestésica fue de $15,3 \pm 2,3$, $19,7 \pm 3,8$, $16,2 \pm 2,6$ y $20,2 \pm 2,9$ para los grupos ISON, ISOH, SEVON y SEVOH respectivamente (**gráfico 24 y tabla 17**).

3.5.5.- COMPARATIVA DE LOS 4 GRUPOS:

Los tiempos de recuperación totales fueron significativamente mayores en los grupos ISOH y SEVOH con respecto a los grupos ISON y SEVON. Los grupos ISON y SEVON no mostraron diferencias significativas entre sí y los grupos ISOH y SEVOH tampoco (**gráfico 24 y tabla 17**). Los resultados de la ANOVA de dos vías indicaron que las diferencias se debieron solamente al factor CAPNIA.

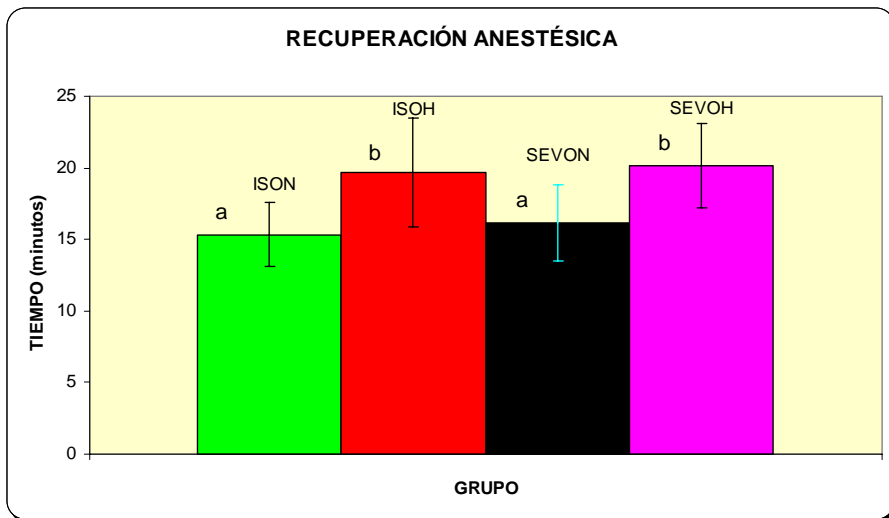


Gráfico 24: Tiempo total de recuperación anestésica, representado con la media \pm SD. Para cada grupo, las medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

	ISON (min)	ISOH (min)	SEVON (min)	SEVOH (min)
EXTUBACIÓN	9,5 \pm 2,4 a	12,5 \pm 2,9 b	11,8 \pm 2,9 b	13,8 \pm 1,0 b
ESTERNAL	2,7 \pm 0,8 a	3,3 \pm 1,6 a	2,7 \pm 1,0 a	4,7 \pm 1,8 b
DEAMBULACIÓN	3,2 \pm 1,3 a	3,8 \pm 1,3 a	1,7 \pm 0,5 b	1,7 \pm 0,8 b
<u>TOTAL</u>	15,3 \pm 2,3 a	19,7 \pm 3,8 b	16,2 \pm 2,6 a	20,2 \pm 2,9 b

Tabla 19: Tiempos de recuperación anestésica. Para cada parámetro, las medias de los grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

DISCUSIÓN

VI.- DISCUSIÓN:

1.- ESTUDIO ELECTORRETINOGRÁFICO:

El diseño experimental de este trabajo estuvo encaminado a detectar variaciones del ERG del perro en función fundamentalmente de dos factores: el tipo de anestésico utilizado y la capnia a la que los animales estuvieron expuestos. Por lo tanto en este apartado discutiremos por un lado los efectos de la capnia sobre el ERG y por otro lado los del distinto tipo de anestésico sobre el mismo. Para ello separaremos las fases fotópicas de las escotópicas y dentro de cada una de ellas discutiremos las características de las ondas registradas desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo (análisis estadístico). Para realizar la discusión de manera clara, seguiremos un esquema lo más similar posible al planteado en la descripción de los resultados.

1.1.- ERG FOTÓPICO:

1.1.1.- ONDA a:

Algunos de los resultados más llamativos de este trabajo, se encontraron en la primera parte fotópica del protocolo electrorretinográfico. Entre los distintos grupos, no hemos encontrado variaciones en cuanto a la *onda a* del Imax (Amax), ni en amplitud, ni en TC, sin embargo observamos una reducción cercana al 20 % en las amplitudes del Vmax (amplitud máxima de la *onda b* en el “photopic hill”) en los grupos sometidos a hipercapnia. El origen de la *onda a* según gran número de autores se atribuye únicamente a la respuesta de los FR, a su hiperpolarización (Noell, 1954; Pepperberg *et al.*, 1978; Lazard *et al* 2000; Benítez del Castillo *et al.*, 2002). Cuando hablamos de ERGs fotópicos con retinas adaptadas a la luz, la *onda a* se limitaría a la actividad de los conos.

Desde que se descubrió el “photopic hill” (Wali y Leguire, 1992), y se generalizó el uso de estímulos de distinta intensidad para evocar ERGs fotópicos, se empezó a rediscutir el origen de la *onda a*. Por otra parte, el descubrimiento de análogos del glutamato que bloquean selectivamente las vías ON u OFF (APB y PDA) de la retina, aportaron información muy valiosa acerca del origen de la *onda a* y de otros componentes del ERG (Slaughter y Miller, 1981; 1983a).

Según Bush y Sieving, la *onda a* refleja ciertamente la actividad de los FR, pero también la de las células bipolares OFF y de las células horizontales (vías OFF). La proporción que uno u otro grupo celular aportan a la *onda a* depende de la intensidad del estímulo luminoso utilizado; así para

estímulos bajos e intermedios las vías OFF son las que mayoritariamente forman la *onda a* mientras que frente a estímulos intensos serían los FR (Bush y Sieving, 1994). Este hecho ha sido confirmado recientemente en monos (Robson *et al.*, 2003; Ueno *et al.*, 2004) gatos (Robson y Frishman, 1996) y en el hombre (Friedburg *et al.*, 2004).

En el mono el I_{max} se sitúa entorno a los $0,7 \text{ cd.s.m}^{-2}$ y con esta intensidad de estímulo luminoso la proporción de *onda a* que permanece tras aplicar PDA, es pequeña lo cual indica que estamos frente a estímulos intermedios o incluso bajos en los que gran parte de la *onda a* proviene de las vías OFF (Ueno *et al.*, 2004). El PDA, bloquea la actividad postreceptoral de las vías OFF. Es un aminoácido excitador que bloquea el flujo desde los FR hacia las células bipolares OFF, bloqueando también la actividad de las células horizontales. En presencia de PDA las células horizontales y las bipolares OFF no responden a la luz (Slaughter y Miller, 1983a).

En nuestro experimento el I_{max} medio para todos los grupos osciló entre $0,06$ y $-0,19 \text{ log cd.s.m}^{-2}$ y a nivel individual nunca superó los $0,51 \text{ log cd.s.m}^{-2}$ con lo que es muy probable que estas intensidades de estímulos no sean suficientes para evocar una *onda a* cuya respuesta esté dominada por la actividad de los FR. Por otra parte, en el último protocolo estándar publicado por la ISCEV, se añade que únicamente los 10 primeros ms de la *onda a* se corresponden con la actividad de los FR (Marmor *et al.*, 2004). En nuestro trabajo, para todos los grupos, la *onda a* tuvo un TC de unos 8 ms para el estímulo más intenso utilizado y de unos 16 ms para el estímulo menos intenso al que la *onda a* todavía era visible. En I_{max} , el TC medio estuvo entorno a los 12 ms en todos los grupos.

Creemos que los estímulos utilizados en nuestro trabajo, particularmente los que dieron lugar a I_{max} fueron de intensidad baja o intermedia, y que provocan una *onda a* en el ERG originada principalmente en las vías OFF. Esto explicaría que independientemente de que la hipercapnia afectase a los FR, no encontramos diferencias entre los grupos en A_{max} , ya que a esas intensidades de estímulo y con esos TCs, la *onda a* se debería fundamentalmente a la actividad de las células bipolares OFF y a las horizontales (vías OFF). Por lo tanto esto nos lleva a pensar que la hipercapnia no afecta a las vías OFF.

1.1.2.- ONDA b:

La hipercapnia disminuyó significativamente la amplitud de la *onda b* en el I_{max} (V_{max}). El origen de la *onda b* del ERG de pleno campo fotópico, se basa en un modelo muy aceptado por la comunidad científica de tira y afloja (“push-pull model”) entre las vías ON y las vías OFF (Sieving *et al.*, 1994). Por otro lado algunos investigadores atribuyen un papel a la cinética de las células de Müller (Miller y Dowling, 1970; Newman, 1980) así como a células de tercer orden (Dong y Hare,

2000), en su formación mientras que otros opinan que ni estas ni aquellas tienen gran influencia en su origen (Ueno *et al.*, 2004). Se puede decir, en base al modelo propuesto por Sieving *et al.*, que las vías ON tienden a dar amplitud positiva a la *onda b* (despolarización de las células bipolares ON) mientras que las vías OFF tienden a darle amplitud negativa (hiperpolarización de las células bipolares OFF) (Sieving *et al.*, 1991; 1994). En nuestro estudio la *onda b* fue significativamente menor en cuanto a amplitud en los grupos hipercápnicos. Según el modelo de Sieving *et al.*, una disminución en la amplitud de la *onda b* se debe a una disminución de las respuestas ON, un aumento de las OFF o un desfase entre ambas (retraso de las OFF), o a la combinación de alguna de estas tres situaciones (Sieving *et al.*, 1994). Como hemos visto anteriormente analizando la *onda a*, las vías OFF no se verían afectadas en amplitud por la hipercapnia, con lo cual la reducción del Vmax con la hipercapnia solo se puede deber a una reducción de las vías ON o a un retraso de las OFF. Como discutiremos a continuación, el análisis del ERG flicker nos ayudó a confirmar estos hechos y a concretar el origen de la disminución de la *onda b* de nuestro experimento.

1.1.3.- ERG FLICKER:

En los ERGs flicker realizados (flicker realizado con la retina adaptada a la luz) también hemos encontrado variaciones. En efecto, en el flicker de menor frecuencia temporal realizado, el de 6 Hz, la amplitud disminuyó con la hipercapnia, sin embargo en el de mayor frecuencia temporal (30 Hz), no observamos efecto alguno de la hipercapnia sobre su amplitud. En cuanto a las frecuencias intermedias (12 y 20 Hz) de flicker medidas, se han encontrado leves disminuciones de la amplitud en los grupos hipercápnicos que no llegaron a dar significación tras el análisis estadístico. Estos hallazgos nos hacen pensar que el ERG flicker del perro tiene un origen distinto en función de su frecuencia temporal, ya que reaccionan de manera distinta frente a factores externos, en este caso frente a la hipercapnia.

El ERG evocado por estímulos de frecuencia temporal superior a 4 Hz se llama ERG flicker y provoca unas respuestas llamadas entretenidas (Lazard *et al.*, 2000). Cuando se aumenta la frecuencia de estimulación por encima de los 20 Hz sólo los conos son capaces de responder con lo cual las ondas obtenidas serán ondas derivadas solamente de los conos (Dodt, 1951).

En nuestro protocolo siempre realizamos los ERGs flicker en un ambiente fotópico (20 cd/m²) suficiente para desensibilizar a los bastones y con estímulos de intensidad luminosa claramente fotópica, además el primer flicker realizado se hizo con la retina totalmente adaptada a la luz. En esas condiciones las respuestas obtenidas siempre van a estar dominadas por la actividad directa o derivada de los conos aunque se trate de frecuencias menores a los 20 Hz ya que los bastones responden en modo saturación y su respuesta no es graduable (a partir de cierto nivel de

luminosidad ambiente y/o de estímulo responden de la misma manera aunque se aumente o disminuya dicha luminosidad) (Lazard *et al.*, 2000).

El origen del ERG flicker como otros componentes del ERG ha sido motivo de muchos estudios. Según diversos autores, las respuestas evocadas por el ERG flicker se corresponden principalmente con la actividad de los FR (Baron *et al.*, 1979a; 1979b; Abraham *et al.*, 1985), en nuestro caso en particular fundamentalmente de los conos dadas las características y las condiciones de estímulo (ambiente y estímulos netamente fotópicos). Esto dejaría fuera a las células post-receptorales (bipolares ON, bipolares OFF y horizontales) en la formación del flicker. Miller y Dowling por un lado, y Ernst y Arden por el otro, demostraron que las células de Müller, de la rata y de la salamandra respectivamente, no eran capaces de seguir ritmos de estimulación superiores a los 3 Hz con lo que también quedarían fuera (Miller y Dowling, 1970; Ernst y Arden, 1972).

Estudios más recientes que los de Baron *et al.*, se replantearon el origen del ERG flicker. Rosolen *et al.* realizaron ERGs de 1,3 Hz y de 30,3 Hz en varias especies entre ellas el mono y el perro, encontrando resultados dispares sin poder proporcionar una explicación de lo que realmente se está midiendo con el ERG flicker (Rosolen *et al.*, 2004a). Por otro lado, están los hallazgos casuales de Creel *et al.*, que observaron como un aminoácido, la glicina, suprimía el flicker de 30 Hz pero no la *onda a*, indicando que tanto la *onda a* como el flicker, en este caso de 30 Hz, pueden no tener el mismo origen (Creel *et al.*, 1987), como algunos otros autores postularon (Baron *et al.*, 1979a; 1979b; Abraham *et al.*, 1985).

En esta línea Bush y Sieving, se sirvieron de análogos del glutamato (APB y PDA) con el fin de bloquear selectivamente las vías ON, las OFF o ambas (Bush y Sieving 1996). El APB bloquea la actividad postreceptoral de las vías ON. Se trata de un agonista competitivo de los receptores de glutamato (neurotransmisor de los FR) que normalmente conducen las señales visuales hacia las células bipolares ON. En presencia de APB esa sinapsis está constantemente activada simulando una situación de constante oscuridad (Slaughter y Miller, 1981). El PDA, bloquea la actividad postreceptoral de las vías OFF (Slaughter y Miller, 1983a). De esta manera Bush y Sieving demostraron que el flicker de 30 Hz no provenía de los FR, sino de las vías ON y de las OFF (Bush y Sieving 1996). Posteriormente, Kondo y Sieving completaron esta investigación, estudiando en el mono y en el hombre el ERG flicker con varias frecuencias temporales de estímulo y observaron que con frecuencias bajas, el flicker reflejaba la actividad fundamentalmente de los FR y con frecuencias altas de las vías ON y OFF. En efecto, a partir de 4 Hz y hasta 10 Hz la contribución de los conos es mayoritaria y después va disminuyendo aportando la mitad o menos de las respuestas a 16 Hz para finalmente ser minoritaria (menos del 20 %) a partir de 24 Hz (Kondo y Sieving 2001; 2002). Si aplicamos esto a nuestro estudio, podemos afirmar en un primer momento que la hiperancia no afecta a las vías ON ni a las vías OFF, ya que no se observaron diferencias en el

flicker de 30 Hz, y sí afecta a los FR ya que el flicker de 6 Hz tiene una amplitud significativamente menor en los grupos hipercápnicos. En relación a esto último (afección de los FR), podemos apoyarnos también en lo observado en el “photopic hill”, en donde la amplitud de la *onda a* muestra una clara tendencia a ser menor en los grupos hipercápnicos, con los estímulos más intensos utilizados, además de tener unos TCs inferiores a 10 ms a esas intensidades. En efecto, según Marmor *et al.*, solo los primeros ms de la *onda a* representan la actividad de los FR, y según Bush y Sieving solo la *onda a* obtenida con el uso de intensidades de estímulo altas lo hacen (Bush y Sieving, 1994, Marmor *et al.*, 2004).

El mono, al igual que el perro puede ser considerado como una especie diurna a la hora de establecer un protocolo electrorretinográfico según Rosolen *et al.*, de hecho estos autores publicaron varios protocolos estándar para especies animales destinadas a la investigación toxicológica separándolas en especies diurnas y especies nocturnas. El protocolo propuesto por estos investigadores para los monos es idéntico que el propuesto para los perros y es el que hemos utilizado en nuestro estudio (Rosolen *et al.*, 2005d). Por lo tanto asumimos de momento que el modelo propuesto por Kondo y Sieving en el mono se puede aplicar también en el perro

El análisis de estos autores propone un estudio vectorial de los distintos componentes implicados en el ERG flicker. Los tres vectores implicados son los FR, las vías ON y las vías OFF. Los autores subrayan que hay tener en cuenta no solo la amplitud de cada uno de ellos sino también la fase (ángulo) que tienen los unos respecto a los otros. Así, por ejemplo, si el desfase entre el componente ON y el componente OFF es de 180° los vectores tienden a anularse predominando aquel cuya amplitud sea mayor. En el mono esto ocurre a frecuencias de flicker de 10 Hz, en las que el vector que domina es el de los FR ya que los otros dos tienden a anularse. Nosotros hemos trabajado con cuatro frecuencias de flicker distintas (6, 12, 20 y 30) y no tenemos indicios de que a ninguna de esas frecuencias se encuentre el desfase máximo entre los componentes ON y OFF (180°), pero sería un tema de estudio interesante en futuros trabajos. Esta forma de análisis en la que se tienen en cuenta no solo la amplitud sino también la fase de los distintos componentes que forman el ERG, tiene una aplicación clínica interesante ya que puede predecir la morfología del flicker en ciertas enfermedades como la retinitis pigmentaria ligada al cromosoma X (Alexander *et al.*, 2003) o algunas formas de ceguera nocturna estacional congénita (Barnes *et al.*, 2002) conocidas por afectar a las vías ON. En ambas enfermedades la reducción del componente ON aumenta el TC del flicker de 30 Hz pero apenas influye en su amplitud.

El modelo de vectores de Kondo y Sieving permitiría predecir los cambios sufridos por el flicker de altas frecuencias (cercanas a los 30 Hz), en función de las alteraciones (reducciones de amplitudes o retrasos de los componentes ON y OFF) producidas en los componentes que lo originan que a esas frecuencias son mayoritariamente las vías ON y las OFF. En situaciones patológicas o

experimentales se podrían presentar principalmente cuatro situaciones (Kondo y Sieving 2001; 2002):

1. Si se produce un **retraso moderado del componente ON** la amplitud del flicker resultante aumentaría de manera importante mientras que su TC variaría muy poco.
2. Si ese mismo **retraso es en las vías OFF**, la amplitud del flicker se reduciría de manera importante y el TC se retrasaría de forma moderada.
3. Si se produce **un descenso de la amplitud de las vías OFF** se produce un acortamiento moderado de la amplitud del flicker y su TC se acorta.
4. Por último, cuando se producen **disminuciones de amplitud** cercanas al 50 % en el **componente ON**, la amplitud del flicker apenas varía mientras que su TC se retrasaría unos 3 ms. En base a esto se deduce que una disminución en la amplitud del componente ON no modificaría la amplitud del flicker de altas frecuencias (en nuestro caso de 30 Hz) lo cual coincide con nuestros resultados, pero podría llegar a retrasar su TC.

De acuerdo con nuestros resultados las situación 1 y 2 quedarían descartadas ya que cualquiera de las dos hubiera provocado alteraciones en la amplitud del flicker de 30 Hz, lo cual no fue el caso en nuestro experimento. Nuestros resultados en cuanto a la amplitud del flicker concuerdan con la situación 3 y con la 4. La situación número 3 quedaría rechazada por varios motivos. Por un lado y como hemos visto en base a la amplitud de la *onda a*, el componente OFF no se altera con la hipercapnia. Por otra parte una reducción en las vías OFF provocaría un aumento del Vmax lo cual no fue el caso. Por último, en la situación 3 el TC se debería ver acortado. Nos queda entonces la situación número 4 en la que los TCs. Para tratar de confirmar que nuestros grupos hipercápnicos se corresponden con una situación similar a la 4, medimos los TCs de nuestro flicker de 30 Hz observando que en los grupos hipercápnicos los tiempos de culminación se retrasaron de manera significativa 1,3 ms para el grupo SEVOH y 1,8 ms para el grupo ISOH. Como expusimos anteriormente, en nuestro experimento la disminución en la amplitud de la *onda b* de los grupos hipercápnicos, se debió a una disminución de las respuestas ON (situación 4), o a un retraso de las OFF (situación 2). Los resultados obtenidos en el flicker, solo concuerdan con la situación 4. Por lo tanto creemos que la disminución de la *onda b* en el Vmax es debida fundamentalmente a una reducción del componente ON (situación 4).

Resumiendo, es posible que el flicker del perro al igual que el del hombre y el del mono tenga un origen distinto según su frecuencia temporal; fundamentalmente los FR a bajas frecuencias y las vías ON y OFF a altas frecuencias. Por otra parte, tenemos motivos para pensar que la *onda a* del I_{max} registrada en nuestro experimento, debido a las intensidades de estímulo utilizadas (bajas o intermedias), tiene su origen principalmente en las vías OFF y que estas no se ven alteradas de

manera importante por la hipercapnia. En relación a lo observado en el flicker de 6 Hz, y en el “photopic hill” creemos que los FR se ven alterados por la hipercapnia pero al no participar mucho en la formación de la *onda a* con esas intensidades de estímulo, no llegan a provocar diferencias significativas entre grupos en la amplitud de la misma. Por último, pensamos que la reducción de las vías ON provocadas por la hipercapnia, provocan el descenso del Vmax en los grupos ISOH y SEVOH, así como el aumento en los TCs del flicker de 30 Hz.

1.1.4.- RESPUESTA NEGATIVA POSTERIOR A LA ONDA b (PhNR):

Según varios estudios realizados en monos, ratas, humanos y en gatos este potencial lento y negativo del ERG fotópico de pleno campo proviene de la retina interna y en particular de las células ganglionares (Viswanathan y Frishman, 1997; Viswanathan *et al.*, 1999; Viswanathan *et al.*, 2001; Frishman *et al.*, 2002; Raz-Prag *et al.*, 2004). Esta respuesta tiene en el mono un TC de entre 60 y 120 ms (Frishman *et al.*, 2002). Ese TC es muy similar al de la onda negativa N₉₅ del PERG que tiene su origen en las células ganglionares (Holder, 2001). Estos y otros datos fruto de estudios en ojos con patologías del nervio óptico y de las células ganglionares como el glaucoma sugieren que la PhNR proviene de la retina interna, en particular de las células ganglionares (Rangaswamy *et al.*, 2004).

Por otra parte, Rosolen *et al.*, concluyeron que una onda negativa posterior a la *onda b* similar a la PhNR guardaba relación con el *tapetum lucidum* (TL). Tras comparar los ERGs de especies sin TL, el cerdo y el mono, con los de especies con TL, el perro y el gato, observaron que en las especies con TL no tienen o está muy disminuida la negatividad tras la *onda b*. Se cree que esta negatividad posterior a la *onda b* tiene relación con el TL y además se distingue de la PhNR anteriormente descrita, ya que la primera se puede registrar también en condiciones escotópicas (Rosolen *et al.*, 2005a; 2005b).

En base a nuestros resultados podemos decir que la respuesta negativa después de la *onda b* (PhNR) que hemos registrado difiere de la descrita por Frishman *et al.*, en el mono ya que nosotros hemos hallado unos tiempos de culminación medios en todos los grupos cercanos a los 50 ms, mientras que estos autores refieren TCs de entre 60 y 120 ms, por otro lado y acorde con lo constatado por Rosolen *et al.*, también hemos observado esta respuesta negativa en condiciones escotópicas, esta vez con unos TCs que rondaban los 100 ms. Por lo tanto y acorde con este autor pensamos que esta deflexión negativa se puede deber a la presencia de TL, ya que todos los animales que hemos usado lo presentaban.

La PhNR tiene el interés de ser registrada en un ERG de pleno campo convencional, con lo que evitaría tener que realizar un PERG, complicado de realizar sobre todo en animales. Sería interesante comprobar en futuros estudios si esta onda proviene en el perro, al igual que en otras especies, de las capas más internas de la retina, al margen de que guarde relación también con el TL.

1.1.5.- ONDA i:

La *onda i* es un componente del ERG fotópico de reciente discusión en animales (Rosolen *et al.*, 2004b). Para ciertos autores, su origen estaría en las células ganglionares e incluso a nivel más distal (en el nervio óptico) (Rousseau *et al.*, 1996; Rosolen *et al.*, 2003; 2004b). Sin embargo, otros opinan que su origen no está en células de tercer orden (amacrinas y ganglionares) ya que persiste tras la inyección de TTX y de NMDA, y también en situaciones en las que existe patología del nervio óptico y de las células ganglionares (Rangaswamy *et al.*, 2004). Por otro lado en estudios recientes en monos y humanos se consiguió eliminar la *onda i* tras aplicar PDA lo cual indicaría que las vías OFF (bipolares OFF y posiblemente también horizontales) están implicadas en su formación (Ueno *et al.*, 2004).

Nosotros hemos encontrado una *onda i* claramente definida con los estímulos más intensos utilizados (0,81, 0,51 y 0,21 log cd.s.m⁻²), no siendo generalmente evidente dicha onda con estímulos más bajos. Además, el TC de nuestra *onda i* estuvo entorno a los 50 ms lo cual coincide con lo observado por Rosolen *et al.* en el perro y otras especies (Rosolen *et al.*, 2004b). Nosotros, no hemos encontrado diferencias entre los cuatro grupos estudiados lo que nos hace pensar que su origen está en las células bipolares OFF y/o horizontales ya que en base a nuestros resultados, y como ya hemos comentado anteriormente creemos que la hipercapnia a la que expusimos a los animales no afecta las vías OFF. No obstante debemos apuntar que esta onda presentó una gran variabilidad entre individuos en nuestro estudio lo cual se puso de manifiesto con unos CV elevados.

1.1.6.- OPs:

No hemos encontrado diferencias ni en las amplitudes ni en los TCs de los tres OPs estudiados (OP2, OP3 y OP4).

Se piensa que proceden de la capa plexiforme interna pero su origen celular exacto no se conoce aún (Brown y Wiesel, 1961a; 1961b; Brown, 1968). Estudios farmacológicos y con

microelectrodos revelan que son el reflejo de corrientes extracelulares generadas por rutas de feed-back entre células amacrinas, ganglionares y bipolares (Wachtmeister, 1998). Algunos autores han relacionado la pérdida de 2 OPs en el hombre tras lesión en el nervio óptico y/o en las células ganglionares (La Chapelle, 1990). En el perro sin embargo no hay evidencias claras de que tengan relación con células de tercer orden (Yanase y Ogawa, 1996).

Según varios autores los OPs 2 y 3 estarían relacionados con las respuestas ON y el OP4 con las respuestas OFF (Kojima y Zrenner, 1978; Rufiange *et al.*, 2005). En este sentido concuerda con nuestros resultados, ya que no hemos encontrado diferencias significativas en el OP4 (vías OFF no alteradas). Sin embargo, los OPs 2 y 3 tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos, aunque tendieron a ser mas pequeños en los grupos hipercápnicos (disminución de las vías ON). Al igual que la *onda i*, los OPs obtenidos generalmente fueron de pequeña amplitud y presentaron una gran variabilidad (CV elevado). Posiblemente, este hecho también ayudó a no encontrar diferencias significativas en los grupos normocápnicos e hipercápnicos.

Los OPs son muy sensibles a isquemias retinales, por lo tanto situaciones en las que las *ondas a* y *b* permanecen normales en forma y amplitud, los OPs pueden indicar alteraciones isquémicas en la retina interna como puede ocurrir en retinopatías diabéticas (Vadala *et al.*, 2002). Por otra parte Martin *et al.* demostraron que los tiempos angiográficos de varios perros de raza beagle son similares con el uso de isoflurano, halotano o sevoflurano, con lo que el uso de estos 3 anestésicos evoca una respuesta hemodinámica de la retina similar. Esto podría explicar el que no se hayan encontrado diferencias entre los grupos de isoflurano y los de sevoflurano (Martin *et al.*, 2001).

1.1.7.- ERG Y ANESTESIA:

El ERG, salvo contadas excepciones, no se puede realizar en animales despiertos (Komaromy *et al.*, 1998; Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002). La mayoría de los trabajos publicados sobre ERG en animales, en particular en perros, están realizados con anestesia fija. La combinación más utilizada es la de ketamina y algún alfa-2 agonista como la xilacina o la medetomidina (Kommonen y Raitta, 1987; Kommonen, 1988). Estos fármacos tienen la ventaja de modificar muy poco las características del ERG además de mantener los ojos centrados facilitando así la exposición de los mismos frente a los flashes. No obstante, para protocolos de más de 40 minutos es conveniente recurrir a la anestesia con agentes volátiles a pesar de que según la mayoría de autores alteran más el ERG (Kommonen *et al.*, 1988; Yanase y Ogawa, 1996; Sloan, 1988). En nuestro estudio no hemos observado diferencias significativas en ninguno de los parámetros electroretinográficos medidos entre los grupos que recibieron isoflurano y los que recibieron sevoflurano. Los resultados de un estudio realizado con halotano y con sevoflurano, coinciden con los nuestros, al no existir

tampoco diferencias en los ERGs registrados con uno u otro halogenado. En este caso los autores, sólo estudiaron los componentes escotópicos del ERG. Según estos autores los anestésicos volátiles provocan un significativo descenso de la amplitud de la *onda b* escotópica, del STR y un incremento significativo de los OPs (Yanase y Ogawa, 1996).

Rosolen *et al.*, realizaron el “photopic hill” en el perro con anestesia fija (ketamina y medetomidina) (Rosolen *et al.*, 2005d). La morfología de nuestro “photopic hill” fue similar a la observada por dichos autores, pero nosotros observamos unas *ondas b* menores, mientras que las *ondas a* resultaron ser similares. Esto se tradujo en unas relaciones de amplitud b/a menores en nuestro experimento. La colocación de los electrodos activos y de referencia influye en la morfología del ERG y en la relación de amplitud b/a (Mentzer *et al.*, 2005), pero la colocación que usamos en nuestro experimento fue similar a la de estos autores con lo que creemos que las diferencias se deben a que nosotros usamos agentes volátiles.

El propofol (agente que usamos como inductor), tiene pocos efectos sobre los potenciales corticales y subcorticales del perro, mucho menos que los anestésicos inhalatorios (Bergamasco *et al.*, 2003). Por otra parte, el halotano y el isoflurano disminuyen sensiblemente las amplitudes del EEG y de los potenciales evocados visuales en la rata (Antunes *et al.*, 2003a; 2003b) y en el hombre (Sloan, 1998). En cuanto al atracurio, que hemos usado como bloqueante neuromuscular, no hay ningún estudio que relacione los efectos que el atracurio tiene sobre el ERG en particular, pero se sabe que en general los relajantes o bloqueantes musculares no tienen efectos ni sobre el EEG ni sobre los potenciales evocados sensoriales (Sloan, 1988).

El mecanismo por el cual los anestésicos volátiles alteran el ERG no se conoce con certeza. Schlame y Hemmings sugieren que interfieren con la liberación de glutamato en la retina (Schlame y Hemmings, 1995). Teniendo en cuenta que el glutamato es el neurotransmisor con el que funcionan los FR (Massey, 1990), parece coherente que el efecto de los agentes volátiles sobre el mismo sea por lo menos en parte el responsable de la reducción de la *onda b*. Otros autores sugieren que los cambios en el ERG se deben a cambios metabólicos en la retina que provocan una disminución de las amplitudes de las *ondas a* y *b* sin modificar sus TCs (Raitta *et al.*, 1979).

Según nuestras observaciones y teniendo en cuenta que nuestra *onda a* no varió y que nuestra *onda b* fue más pequeña que la obtenida con anestésicos inyectables por Rosolen *et al.*, creemos que los halogenados afectarían más a las vías ON que a las OFF. Esto difiere de lo observado por Tremblay y Parkinson en niños anestesiados con isoflurano o halotano. Estos autores apuntan que en el hombre los halogenados disminuyen sensiblemente la *onda b*, y apenas la *onda a*, al igual que sugerimos nosotros, pero afectando sobre todo a las vías OFF (disminuyéndola y retrasándola) (Tremblay y Parkinson, 2003). En este trabajo el halogenado se combinó con óxido nítrico, el cual se sabe que disminuye la amplitud de ciertos potenciales evocados corticales (Dzolic *et al.*, 1996).

En 1933 Granit utilizó distintos planos anestésicos para descomponer el ERG en sus tres componentes: PI, PII y PIII. En sus trabajos el componente más resistente a la anestesia resultó ser el componente PIII y el menos resistente el PI (Granit, 1933). De su análisis se sabe que la *onda a* se corresponde con el componente negativo PIII, la *onda b* refleja la sumación de PII y PIII, mientras que la tardía *onda c* es la sumación de PI y PIII (Lazard *et al.*, 2000). De manera retrospectiva podríamos deducir que las vías OFF (*onda a* en nuestro estudio) son de forma general más resistentes a la anestesia que las ON.

Esta diferencia en la sensibilidad entre las vías ON y OFF podría ser debida a que los receptores de las células bipolares ON y las células bipolares OFF a pesar de ser ambos de glutamato, son de distinto tipo. En efecto, los receptores de las células bipolares ON son de tipo metabotrópico y los de las OFF de tipo ionotrópico. Los primeros, poseen canales iónicos asociados que están acoplados a proteínas G, y utilizan segundos mensajeros (GMPc), mientras que los receptores ionotrópicos de las bipolares OFF (de tipo AMPA/KA) funcionan modulando la apertura o el cierre de canales iónicos de manera directa ya que receptor y canal forman una única estructura (Nakanishi, 1992; 1994). Según Ishizawa *et al.*, los anestésicos volátiles y en particular el halotano compiten con el retinal y de manera general con ligandos endógenos de proteínas G (Ishizawa *et al.*, 2002). Creemos que esto explicaría porqué los anestésicos volátiles afectan preferentemente a las vías ON cuyos receptores son metabotrópicos y están acoplados a proteínas G.

1.1.8.- ERG E HIPERCAPNIA:

Los efectos del CO₂ sobre el electrorretinograma han sido ampliamente estudiados en el gato. La mayoría de esos estudios valoran las *ondas b* y *c* del ERG, sin embargo, en la bibliografía no encontramos ningún estudio que valore el ERG flicker en situaciones de hipercapnia en el perro. Nuestros resultados mostraron una marcada reducción (entorno al 25 %) en la amplitud de la *onda b* en los grupos hipercápnicos. Esto coincide con lo observado por la mayoría de autores en estudios realizados en gatos (Niemeyer y Steinberg, 1981; Niemeyer *et al.*, 1982; Linsenmeier *et al.*, 1983; Hiroi *et al.*, 1994). Como discutimos anteriormente, creemos que la hipercapnia afecta también a los FR. Para Hiroi *et al.*, el epitelio pigmentario (EPR) es más resistente a la hipercapnia que la neurorretina, mientras que para Linsenmeier *et al.*, los efectos de la hipercapnia se evidencian de manera más temprana en el EPR que en la neurorretina (Linsenmeier *et al.*, 1983).

A oxigenación constante, el efecto vasodilatador del CO₂ en la retina debería hacer aumentar la *onda b*, pero según Niemeyer *et al.*, los efectos del bajo pH son más potentes en este caso y hacen caer la amplitud de la *onda b* (Niemeyer *et al.*, 1982). Un estudio in vitro demostró que la amplitud de *b* también se reducía al acidificar el pH de la retina con HCl (Niemeyer y Steinberg, 1981). Por

lo tanto la hipercapnia altera el ERG no por el acúmulo de CO₂ en sí, sino por la acidosis (respiratoria) que lleva asociada.

En este sentido la hipoxia actuaría de manera similar a la hipercapnia sobre el ERG (Linsenmeier *et al.*, 1983; Derwent y Linsenmeier, 2000) además la *onda a* sería más resistente que la *b* a la hipoxia (Linsenmeier *et al.*, 1983; Derwent y Linsenmeier, 2000). Esto se debe a que los FR en situaciones de hipoxia mantienen su producción de energía disminuyendo su metabolismo aerobio y aumentando la glucólisis anaerobia, lo cual hace disminuir el pH. Por lo que en hipoxia los cambios en el ERG se deben en principio a cambios en el ambiente iónico (debidos a la acidosis local) más que a problemas para la obtención de energía debido a la escasez de O₂ (Derwent y Linsenmeier, 2000). Hay que señalar que en situaciones de hipoxia la glucólisis anaerobia provoca acidosis intra y extra celular, mientras que concentraciones altas de CO₂ provocan efectos más rápidos sobre el pH intracelular que sobre el extracelular (Hiroi *et al.*, 1994), con lo que ambas situaciones provocan alteraciones sobre el ERG de manera similar pero no idéntica.

Como comentamos anteriormente la neuroretina, se nutre de los vasos retinianos mientras que el EPR y las capas más externas de la neuroretina, los FR, se nutren fundamentalmente de los vasos coroidianos (Samuelson, 1999). Por otra parte la acidosis respiratoria que acompaña a la hipercapnia se pone de manifiesto en ambas circulaciones. En ese sentido, nosotros hemos encontrado efectos de la hipercapnia sobre los FR con reducción del flicker de 6 Hz, e intensidades fuertes del “photopic hill” (circulación coroidiana) y sobre las células bipolares ON con reducción de la *onda b* en I_{max} (circulación retiniana).

No tenemos datos suficientes para saber si la hipercapnia afecta antes a la neuroretina (Hiroi *et al.*, 1994) o al EPR (Linsenmeier *et al.*, 1983). No obstante, se sabe que la hipercapnia con su acidosis respiratoria asociada, estimula la producción de óxido nítrico por parte del endotelio vascular y sobre todo por parte de ciertas neuronas de la retina lo cual provoca vasodilatación. Las neuronas lo secretan mejor a pH bajos y las células endoteliales mejor a pH alcalinos en el encéfalo (Sato *et al.*, 2003). En la retina de los mamíferos se encontró óxido nítrico en los FR, en las células amacrinas, en las de Müller, en las horizontales y en las ganglionares (Venturini *et al.*, 1991). En este sentido la neuroretina podría tener mejor capacidad de respuesta a la hipercapnia ya que además de las células endoteliales hay otras células que producen óxido nítrico y además lo hacen mejor con pH bajo. Por otra parte, teniendo en cuenta que en la membrana apical del EPR existen canales e intercambiadores iónicos que ayudan a regular el pH en el espacio subretiniano, podríamos suponer que la acidosis se controla mejor en las cercanías del EPR (Joseph y Miller, 1991).

En todo caso creemos que la hipercapnia a la que sometimos a los animales fue de suficiente entidad para afectar tanto al EPR como a la neuroretina ya que trabajamos con FEFCO₂ de 65 ± 3 ,

lo cual se corresponde con una PaCO_2 de unos 70 mmHg (Mc Murphy, 1999). En los experimentos de Niemeyer *et al.*, presiones arteriales de CO_2 de 60 mmHg se correspondieron con pH de 7,08 (Niemeyer *et al.*, 1982). Según Linsenmeier *et al.*, las alteraciones en el EPR aparecen a pH 7,3 y en la neurorretina a pH de 7,2. Creemos, que con presiones de 60 mmHg o más de CO_2 las alteraciones deberían aparecer tanto en la neurorretina como en el EPR.

Creemos, que al igual que con los anestésicos volátiles, las células bipolares OFF podrían ser más resistentes a la hipercapnia a pesar de depender de la circulación retiniana al igual que las células bipolares ON. Esto podría ser debido como ya comentamos anteriormente a que los receptores de las células bipolares ON y las células bipolares OFF son de distinto tipo (metabotrópico e ionotrópico respectivamente) (Nakanishi, 1992; 1994). Además, como ya comentamos concentraciones altas de CO_2 provocan efectos más rápidos sobre el pH intracelular que sobre el extracelular (Hiroi *et al.*, 1994). Es posible que ese incremento intracelular interfiera con el correcto funcionamiento de la proteína G acoplada a los receptores metabotrópicos de las células bipolares ON.

Estos hallazgos nos hacen pensar que la hipercapnia podría ser una herramienta útil y reversible en la separación para su estudio de las vías ON y OFF de la retina, como alternativa a algunos análogos del glutamato como el APB o el PDA que, aunque muy eficaces, requieren una técnica de aplicación específica y poseen ciertos efectos secundarios (Slaughter y Miller, 1981; 1983a).

1.1.9.- ERG Y OTROS FACTORES DE VARIACIÓN:

1.1.9.1.- PaO_2 :

En nuestro estudio todos los animales fueron ventilados con una elevada fracción inspiratoria de O_2 (FiO_2) ($75 \pm 3 \%$). Aplicando la fórmula $\text{PaO}_2 = \text{FiO}_2 \times 5$ (Mc Donnell, 1996), obtenemos una PaO_2 teórica superior a los 300 mmHg. La hiperoxia tanto moderada (250 mmHg) como severa (400 mmHg) no provoca cambios significativos sobre la *onda b* del ERG del gato (Niemeyer *et al.*, 1982). Por otra parte la PaO_2 no debió de ser significativamente distinta entre los 4 grupos, a pesar de las diferencias en volumen minuto y en frecuencia respiratoria que manejamos de manera artificial para obtener hipercapnia en los grupos ISOH y SEVOH. Creemos que los cambios que hemos observado en nuestro estudio, descritos anteriormente, no se debieron a diferencias en las presiones sanguíneas de O_2 .

1.1.9.2.- PAM:

Los vasos retinianos tienen un gran poder de autorregulación, mucho mayor que los coroidianos (Demant *et al.*, 1982; Delaey y Van de Voorde, 2000). De hecho, en cuanto a las fluctuaciones en la PAM, se observó en el gato y en el hombre que los vasos retinianos tienen una capacidad de regulación en un rango muy amplio de PAM, permaneciendo la *onda b* inalterada con presiones tan bajas como 50-55 mmHg y tan altas como 255 mmHg (Demant *et al.*, 1982). En nuestro trabajo no hemos hallado diferencias significativas en los valores de la PAM en ninguno de los 4 grupos, además siempre estuvieron dentro del rango anterior (50-255 mmHg), por eso es muy improbable que los cambios observados en el ERG de los animales hipercápnicos fueran debidos a variaciones de la PAM.

1.1.9.3.- PIO:

En nuestro experimento, no hemos medido la PIO, para no modificar la posición de los fotoestimuladores durante el protocolo electrorretinográfico y evitar así una posible fuente de variación. Los anestésicos volátiles tienen muy pocos efectos sobre la PIO del hombre así como en la del perro y la combinación de atracurio con los mismos tampoco (Mc Murphy *et al.*, 2004; Kastrup *et al.*, 2005). El propofol no modifica la PIO (Batista *et al.*, 2003). El atracurio no modifica la PIO en el perro cuando se usa con isoflurano (Mc Murphy *et al.*, 2004) o con sevoflurano (Kastrup *et al.*, 2005). Petounis *et al.* refieren aumentos de la PIO en situaciones de hipercapnia en el hombre (Petounis *et al.*, 1980). En base a esto podríamos suponer que los animales de los grupos hipercápnicos presentaron una mayor PIO que los normocápnicos.

La presión intraocular (PIO) tiene gran influencia en la funcionalidad retiniana. En efecto, una PIO elevada sostenida en el tiempo provoca daños en las células ganglionares (Mittag *et al.*, 2000). Por eso en electrofisiología la prueba más sensible para detectar los daños causados por una elevada PIO es el PERG (Holder, 2001; Parisi *et al.*, 2006; Atilla *et al.*, 2006). Se sabe que la respuesta autorreguladora de la retina era capaz de compensar una PIO de hasta 30 mmHg. Por otro lado si la elevación de la PIO dura poco tiempo no afecta a la vasodilatación retiniana en respuesta al flicker ni al propio flicker, indicando que los mecanismos de autorregulación vascular siguen funcionando en esas condiciones al menos en el hombre (Garhofer *et al.*, 2005). Se han realizado muchos estudios sobre los efectos de aumentos agudos de la PIO sobre el ERG en animales y en el hombre. Generalmente no aparecen cambios en el ERG de pleno campo a no ser que se superen presiones críticas del orden de 60 mmHg (Feghali *et al.*, 1991). Todos estos datos nos indican que las diferencias observadas en los ERGs de los grupos hipercápnicos, probablemente no fueran debidas a diferencias de PIO entre grupos.

1.2.- ERG ESCOTÓPICO:

1.2.1.- ADAPTO- ELECTORRETINOGRAMA (AERG):

Hemos observado que en los grupos hipercápnicos la amplitud de la *onda b* fue significativamente menor al final de la adaptación que en los grupos normocápnicos. La reducción de amplitud en los grupos hipercápnicos fue cercana al 40 %. Se trata de una considerable reducción teniendo en cuenta que la reducción de la *onda b* en la parte fotópica fue del 20% y la de los FR del 25 %. Estos datos, al igual que ocurría en la primera fase fotópica, coinciden con los de la mayoría de autores que estudiaron los efectos de la hipercania en la *onda b* del ERG del gato (Niemeyer y Steinberg, 1981; Niemeyer *et al.*, 1982; Linsenmeier *et al.*, 1983; Hiroi *et al.*, 1994).

Creemos que los motivos de la reducción de la *onda b* en esta parte escotópica se deben a los mismos factores que ya discutimos en el apartado fotópico pero al que debemos añadir algún dato más para explicar el mayor porcentaje de reducción.

El AERG es un estudio dinámico de la adaptación de la retina a la oscuridad efectuándose conjuntamente con el epitelio pigmentario y puesta de manifiesto mediante el ERG. Es un examen fácil de llevar a cabo en la clínica cotidiana y adaptable a todas las especies incluida la humana (Rosolen *et al.*, 1997; Rosolen y Lazard, 1997; Lazard *et al.*, 2000). Cuando la retina está suficientemente adaptada a un nivel luminoso fotópico (por ejemplo 2 horas de luz diurna 17-30 cd/m²) la diferencia de potencial del dipolo córnea-retina es estable. Cuando colocamos al animal en un ambiente oscuro los FR (en este caso los bastones) de la retina retornan rápidamente a su estado inicial de despolarización y regeneran más lentamente sus fotopigmentos necesitando para ello obligatoriamente mediación del EPR, en el caso de los bastones (Kommonen *et al.*, 1991; Crouch *et al.*, 1996). Estos cambios originan variaciones de potenciales en el EPR, que se reflejan sobre los valores del dipolo córneo-retiniano (Steinberg, 1985; Marmor, 1991). Por lo tanto si recogemos la respuesta electrorretinográfica generada por los bastones durante su adaptación a la oscuridad obtendremos variaciones en amplitud de dichas respuestas que son el reflejo indirecto de la variación del potencial de base del EPR (Steinberg, 1985). Por otra parte estamos midiendo de manera indirecta la capacidad del EPR para reponer la rodopsina que los bastones necesitan para realizar la fototransducción. Tras haber estado expuestos a un ambiente luminoso más o menos intenso, los bastones tienen parte de sus fotopigmentos blanqueados. Cuando se restablece el ambiente escotópico, el EPR es el encargado de reponer la rodopsina blanqueada, este proceso se denomina adaptación a la oscuridad (Crouch *et al.*, 1996).

Como expusimos anteriormente la hipercapnia afecta al EPR y a la neurorretina. Al margen de cual de estas estructuras se vea afectada en mayor medida, creemos que la hipercapnia inducida a los animales de los grupos ISOH y SEVOH con la consiguiente acidosis respiratoria fue de suficiente entidad para afectar a ambas estructuras. De tal manera que es posible que el EPR en situación de hipercapnia no funcione en condiciones óptimas y entre otras cosas tenga menor capacidad para reponer rodopsina.

Por otra parte conviene añadir que los bastones, aunque por medio de células amacrinas de tipo AII pueden utilizar la vía OFF, funcionan esencialmente bajo el modo ON (Sharpe y Stockman, 1999; Kolb, 2003). Como discutimos anteriormente la vía ON se vería afectada por la hipercapnia. Esto, sumado a los mismos fenómenos descritos antes en la parte fotópica, ayudarían a explicar el gran porcentaje de reducción obtenido.

En este punto nos parece interesante hacer referencia a la acción de ciertos anestésicos volátiles sobre la rodopsina. En efecto, recientemente se relacionó al halotano con cierto grado de protección a la retina de ratas ante estímulos luminosos muy intensos (Keller *et al.*, 2001) que causan daños en los FR por apoptosis (Noell *et al.*, 1966). Tales daños ocurren por fosforilación de la rodopsina y solo ocurren en presencia de la misma, es decir cuando ésta tiene un ritmo de regeneración tras blanqueamiento rápido (Grimm *et al.*, 2001; Ablonczy *et al.*, 2005). Como consecuencia las retinas de pacientes anestesiados con halotano estarían protegidas frente a la degeneración inducida por la luz. El mecanismo exacto mediante el cual el halotano inhibe la regeneración de rodopsina se desconoce, podría tratarse de competencia con el retinal (Keller *et al.*, 2001). En efecto, ciertos autores opinan que los anestésicos volátiles y en particular al halotano compiten con el retinal y de manera general con ligandos endógenos de proteínas G (Ishizawa *et al.*, 2002).

Este efecto inhibitor del halotano sobre la regeneración de la rodopsina blanqueada, no se encontró con otros anestésicos como la ketamina o la xilacina en ratas y los autores no descartan que efectos similares se encuentren con otros anestésicos volátiles (Keller *et al.*, 2001). Esto explicaría las diferencias encontradas en nuestro estudio del AERG con respecto a otro similar realizado por Rosolen *et al.* también en raza beagle pero utilizando como anestésico la mezcla de ketamina con medetomidina (Rosolen *et al.*, 2002), en efecto, este autor obtuvo amplitudes de la *onda b* mayores a los nuestros desde el minuto 0 de adaptación. En base a esto, creemos que tanto el isoflurano como el sevoflurano interfieren en alguna medida con la regeneración de la rodopsina, y que esto se puso de manifiesto con unas amplitudes moderadas de la *onda b* durante el AERG. No obstante es improbable que tanto el isoflurano como el sevoflurano tengan un efecto sobre la regeneración de la rodopsina tan acusado en el perro como el descrito por Keller *et al.* del halotano en la rata ya que la *onda b* en todos los casos fue creciendo en amplitud durante los 32 minutos de adaptación a la oscuridad indicando que parte de la rodopsina se tuvo que reponer. En este sentido consideramos

que sería interesante en futuros estudios valorar el AERG del perro sometido a anestesia con halotano para tratar de confirmar lo observado por Keller *et al.* en la rata.

1.2.2.- SINGLE FLASH (SF):

El single flash es el ERG obtenido en respuesta a un solo estímulo luminoso (Narfström *et al.*, 2002; Marmor *et al.*, 2004) en nuestro caso, de nivel luminoso fotópico realizado en un ambiente luminoso escotópico. En estas condiciones de estimulación se obtiene una respuesta en masa y global de la retina que proviene de los conos y de los bastones (Lazard *et al.*, 2000; Narfström *et al.*, 2002). No hemos encontrado diferencias significativas en las características de la *onda a*, creemos que se debe a los mismos motivos que ya hemos discutido anteriormente. En cuanto a la *onda b* se aprecia una reducción que no llega a ser estadísticamente significativa en los grupos hipercápnicos.

Este tipo de estimulación tiene la ventaja de poner en actividad de manera global toda la retina evocando ondas de gran amplitud, pero el inconveniente de ser una respuesta muy contaminada. La señal última obtenida por un electrorretinógrafo puede no ser discernible del ruido con lo que es importante extraerla realizando una mejora de la relación señal/ruido. En efecto, cuando hacemos n estímulos repetidos se postula que la señal biológica generada es idéntica en cada uno de esos n estímulos mientras que el ruido es aleatorio. Así repitiendo n veces el estímulo se recoge n veces la misma señal biológica y distinto ruido, con lo que efectuando la suma y media de estas n señales la amplitud de la señal biológica presenta una mejora proporcional a la raíz cuadrada de n mientras que el ruido (aleatorio) es cada vez de menor amplitud. N es el número de veces que repetiremos el estímulo. De manera general, en el caso del ERG, se realiza una mejora señal/ruido de 3 a 4, con lo que entre 9 y 16 estímulos suelen ser suficientes (Lazard *et al.*, 2000). Por este motivo en los ERGs del “photopic hill” se realizaron 15 estímulos (Rosolen *et al.*, 2005d). En el caso del single flash no se produce esa mejora señal/ruido al hacer un solo estímulo, con lo que las respuestas aparecen con gran cantidad de ruido que es aleatorio (Lazard *et al.*, 200; Komaromy *et al.*, 2002). Creemos que este fue el motivo que nos impidió encontrar diferencias significativas en la amplitud de la *onda b* del single flash.

1.1.7.- EFECTO DE ADAPTACIÓN A LA LUZ:

A nivel de los conos existe un fenómeno de adaptación a distintos ambientes luminosos. Así cuando se pasa de un ambiente oscuro a uno iluminado, si se realizan ERGs se aprecia que las

amplitudes van aumentando durante los primeros minutos, esto se conoce como efecto de adaptación a la luz. Algunos autores creen que se trata de cambios en el potencial de reposo (Biersdorf y Armington, 1960) y otros que se trata de re-despolarizaciones que tienen lugar en los conos (Gouras y Mackai, 1989). Según Benoit y Lachapelle este efecto está mediado no por uno, sino por dos mecanismos o rutas retinianas distintas, todavía desconocidas (Benoit y Lachapelle, 1995).

En esta última parte del protocolo electrorretinográfico, en la que pasamos de un ambiente oscuro a otro luminoso, tratamos de observar el efecto de adaptación a la luz de los conos realizando varios ERG flicker en el minuto cero de ambiente fotópico y otros tantos tras diez minutos de adaptación a dicho ambiente. En nuestro estudio no hemos observado efecto de adaptación a la luz alguno, incluso en ciertos casos las amplitudes del flicker no aumentaron sino que incluso disminuyeron. Nosotros, al igual que la mayoría de los autores hemos utilizado tropicamida como dilatador pupilar. La tropicamida tiene un inicio de acción rápido (10-15 minutos en el perro), pero su duración y potencia son más cortas en comparación con la atropina (Rubin y Wolfes, 1962). Nuestro protocolo duró alrededor de 75 minutos, durante los cuales ya no se administró más tropicamida. Por otro lado, al terminar la fase escotópica, los perros tuvieron diámetros pupilares máximos ya que además de estar bajo los efectos de la tropicamida venían de pasar unos 35 minutos en completa oscuridad. Al reestablecer el ambiente fotópico y realizar las cuatro series de flicker en el tiempo cero, creemos que el diámetro pupilar disminuyó a causa de la gran cantidad de luz aportada a la retina con el ERG flicker. Por lo tanto diez minutos después al realizar la segunda serie de ERG flicker, la pupila presentó un tamaño significativamente menor, con lo que las amplitudes no aumentaron, e incluso en algunos casos disminuyeron. Esto lo pudimos confirmar midiendo el diámetro pupilar antes y después del experimento resultando en todos los grupos ser significativamente menor al final del experimento.

Existe un concepto muy importante que es el de **iluminación retiniana (IR)**, definido por la siguiente fórmula: $IR = 0,36 \times \varnothing \times S \times L$ en donde \varnothing es la transmitancia de los medios transparentes del ojo sin unidades, S la superficie pupilar en mm^2 y L la luminancia de la estimulación en cd/m^2 . Esta fórmula expresa de forma clara la importancia del diámetro pupilar y de la transparencia de los medios. En efecto, una disminución moderada en el diámetro pupilar podría implicar una disminución en la iluminación retiniana de hasta 1 log (Lazard *et al.*, 2000). En base a esto creemos que para protocolos de larga duración es conveniente utilizar otros midriáticos más potentes y duraderos o repetir las instilaciones de tropicamida durante el experimento. Asimismo, es posible que a la hora de valorar el efecto de adaptación a la luz sea más conveniente utilizar el ERG convencional en lugar del ERG flicker, el cual aporta más cantidad de luz a la retina y por lo tanto puede llegar a modificar el diámetro pupilar si el midriático usado fue perdiendo efecto.

2.- ESTUDIO ANESTÉSICO:

Todos los anestésicos inhalatorios provocan hipotensión sistémica por disminución de la resistencia vascular periférica (Steffey, 1996). Estos efectos son similares entre el isoflurano y el sevoflurano y menores con el halotano (Mutoh *et al.*, 1997). Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones, ya que en todos los grupos disminuyó la PAM desde el minuto 5 y luego se fue recuperando paulatinamente hasta el final del experimento. El propofol provoca hipotensión transitoria tras su inyección intravenosa, tiene una farmacocinética rápida y sus efectos cardiovasculares desaparecen a los pocos minutos de su administración (Nakaigawa *et al.*, 1995). Creemos que esto puede explicar que la hipotensión fuese más severa en los primeros minutos de la anestesia, tras la administración de propofol.

Los efectos de la hipercapnia sobre la PAM son en un primer momento hipotensión por disminución de la resistencia vascular periférica y a continuación recuperación de la PAM por vasoconstricción mediada por un reflejo simpático (Mc Donell, 1996). Atendiendo a esto último la PAM de los grupos hipercápnicos debería haber sido sensiblemente superior a la de los grupos normocápnicos. En nuestro experimento no fue el caso, lo cual pudo ser debido a que se utilizó un método de medición de presiones arteriales no invasivo. Dichos métodos aunque nada cruentos son menos precisos que los invasivos (Haskins, 1996). Los objetivos de este estudio y su diseño experimental estuvieron encaminados a detectar variaciones en los parámetros electroretinográficos. En ese sentido es posible que el número de perros no fuera suficiente para detectar diferencias significativas en la PAM ya que en los grupos hipercápnicos sí que se observó cierta tendencia pero que no llegó a ser significativa a tener una mayor PAM. La FC aumentó en los primeros minutos y luego fue disminuyendo progresivamente, esto posiblemente ocurrió para compensar la caída inicial de PAM.

Los agentes volátiles más usados en veterinaria son el halotano, el isoflurano y el sevoflurano, este último de incorporación más reciente tiene la ventaja de no irritar apenas las vías respiratorias (Steffey, 1996). La concentración alveolar mínima (CAM) de estos agentes son $2,09 \pm 0,13$, $1,30 \pm 0,12$ y $0,94 \pm 0,09$ para el sevoflurano, isoflurano y halotano respectivamente. Cuando se utilizan concentraciones de entre 1 y 1,5 CAM en el perro, es capaz de respirar de manera espontánea (Mutoh *et al.*, 1997). En nuestro experimento hemos utilizado propofol para la inducción anestésica y atracurio como bloqueante muscular, la concentración de anestésico fue de 1,4 CAM. En el perro y el gato el uso de propofol para la intubación y posterior mantenimiento con anestésicos volátiles no afecta a los tiempos de recuperación anestésico (Weaver y Raptopoulos, 1990). El atracurio no modifica la presión arterial en el perro cuando se usa con isoflurano (Mc Murphy *et al.*, 2004) o

con sevoflurano (Kastrup *et al.*, 2005). Su efecto es de duración intermedia comparándolo con otros bloqueantes, y depende del anestésico con el que esté asociado; con anestésicos halogenados dura de 20 a 35 minutos y con anestésicos inyectables como el propofol de 10 a 15 minutos (Kastrup *et al.*, 2005; Nagahama *et al.*, 2006). Esto coincide con nuestras observaciones ya que el atracurio consiguió un bloqueo muscular efectivo durante todo el experimento que duró entre 70 y 75 minutos, siendo necesario rebloquear una sola vez.

La calidad de la anestesia es buena con los tres agentes y presentan unos tiempos de recuperación similares (Martin *et al.*, 2001). Aunque según Mutoh *et al.*, el sevoflurano produce tiempos de recuperación más bajos (Mutoh *et al.*, 1997). Coincidimos Martin *et al.*, en cuanto a los tiempos de recuperación ya que no variaron entre el isoflurano y el sevoflurano. Sin embargo, los tiempos totales de recuperación fueron mayores en los grupos hipercápnicos. Creemos que esto se debe al efecto narcotizante que posee el CO₂ a altas concentraciones (Mc Donell, 1996). La calidad de la anestesia fue buena en todos los casos y la recuperación resultó suave, tranquila y rápida coincidiendo con lo observado por otros autores con estos mismos anestésicos (Mutoh *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2001).

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES:

1. La anestesia con isoflurano o sevoflurano en normocapnia, es adecuada para la realización del electrorretinograma en el perro.
2. El electrorretinograma obtenido de perros anestesiados con isoflurano no presenta diferencias significativas con respecto al electrorretinograma obtenido de perros anestesiados con sevoflurano.
3. A las intensidades de estímulo utilizadas en este experimento, la *onda a* del electrorretinograma del perro refleja fundamentalmente la actividad de las vías OFF, y estas no se alteran de manera significativa con la hipercapnia.
4. La hipercapnia disminuye de manera significativa la respuesta de las vías ON, lo cual se pone de manifiesto con *ondas b* de menor amplitud tanto en fotópico como en escotópico.
5. La hipercapnia disminuye de manera significativa la respuesta de los fotorreceptores.
6. El ERG flicker en el perro tiene un origen diferente en función de la frecuencia temporal de estímulo utilizada, representando mayoritariamente la actividad de los fotorreceptores a frecuencias temporales de estímulo bajas (6Hz), y la de las vías ON y OFF a intensidades de estímulo altas (30 Hz).

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

BIBLIOGRAFÍA

VIII.- BIBLIOGRAFÍA.-

1. **Ablonczy Z, Darrow RM, Knapp DR, Organisciak DT, Crouch RK (2005):** Rhodopsin phosphorylation in rats exposed to intense light. *Photochemistry and Photobiology*. 81 (3), pps.: 541-547.
2. **Abraham FA, Alpern M, y Kirk DB (1985):** Electroretinograms evoked by sinusoidal excitation of human cones. *The Journal of Physiology*. 363 (1), pps.: 135–150.
3. **Acland GM (1988):** Diagnosis and differentiation of retinal diseases in small animals by electroretinography. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*. 3 (1), pps.: 15-27.
4. **Aguirre GD, Rubin LF, Bistner SI (1972):** Development of the canine eye. *American Journal of Veterinary Research*. 33 (12), pps.: 2399-2414.
5. **Ahnelt P, Kolb H (1994):** Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: a Golgi-electron microscopic study of spectral connectivity. *The Journal of comparative neurology*. 343 (3), pps.: 406-427.
6. **Alexander KR, Barnes CS, Fishman GA (2003):** ON-pathway dysfunction and timing properties of the flicker ERG in carriers of X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 44 (9), pps.: 4017-4025.
7. **Almeida DE, Rezende ML, Nunes N, Laus JL (2004):** Evaluation of intraocular pressure in association with cardiovascular parameters in normocapnic dogs anesthetized with sevoflurane and desflurane. *Veterinary Ophthalmology*. 7 (4), pps.: 265– 269.
8. **Andreasen M, Lambert JD, Jensen MS (1989):** Effects of new non-N-methyl-D-aspartate antagonists on synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *The Journal of Physiology*. 414, pps.:317-336.
9. **Antunes LM, Golledge HD, Roughan JV, Flecknell PA (2003a):** Comparison of electroencephalogram activity and auditory evoked responses during isoflurane and halothane anaesthesia in the rat. *Veterinary anaesthesia and analgesia*. 30 (1), pps.:15-23.
10. **Antunes LM, Roughan JV, Flecknell PA (2003b):** Effects of different propofol infusion rates on EEG activity and AEP responses in rats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 26 (5), pps.: 369-376.
11. **Arden GB, Barrada A, Kelsey JH (1962):** New clinical test of retinal function based upon the standing potential of eye. *The British journal of ophthalmology*. 46 (8), pps.: 449-467.

12. **Arden GB, Brown KT (1965):** Some properties of components of the cat electroretinogram revealed by local recording under oil. *The Journal of Physiology*. 176 (3), pps.: 429-461.
13. **Armitage JA, Bui BV, Gibson R, Vingrys AJ (2001):** Postnatal development of flicker sensitivity in guinea pigs. *Clinical and experimental optometry: journal of the Australian Optometrical Association*. 84 (5), pps.: 270-275.
14. **Atilla H, Tekeli O, Ornek K, Batioglu F, Elhan AH, Eryilmaz T (2006):** Pattern electroretinography and visual evoked potentials in optic nerve diseases. *Journal of clinical neuroscience*. 13 (1), pps.: 55-59.
15. **Bach M, Meigen T (1999):** Doe's and don'ts in Fourier analysis of steady-state potentials. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 99 (1), pps.: 69-82.
16. **Bach M, Hawlina M, Holder GE, Marmor MF, Meigen T, Vaegan, Miyake Y (2000):** Standard for pattern electroretinography. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 101 (1), pps.: 11-18.
17. **Barnes CS, Alexander KR, Fishman GA (2002):** A distinctive form of congenital stationary night blindness with cone ON-pathway dysfunction. *Ophthalmology*. 109 (3), pps.: 575-583.
18. **Baron WS, Boynton RM y Hammon RW (1979a):** Component analysis of the foveal local electroretinogram elicited with sinusoidal flicker. *Vision Research*. 19 (5), pps.: 479-490.
19. **Baron WS, Boynton RM y Norren D (1979b):** Primate cone sensitivity to flicker during light and dark adaptation as indicated by the foveal local electroretinogram. *Vision research*. 19 (2), pps.: 109-116.
20. **Batista CM, Laus JL, Nunes N; Patto dos Santos PS, Costa JLO (2003):** Evaluation of intraocular and partial CO2 pressure in dogs anesthetized with propofol. *Veterinary Ophtalmology*. 3 (1), pps.: 17-19.
21. **Baylor DA (1987):** Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 28 (1), pps.: 34-49.
22. **Benítez del Castillo JM. Pérez Salvador JL, Benítez del Castillo Sánchez J, Pérez-Salvador García E, (Eds.) (2002):** *Manual básico de electrofisiología ocular: sus aplicaciones en la práctica clínica*. 1ª edición, Mac Line, Madrid. 128 pps.
23. **Benoit J, Lachapelle P (1995):** Light adaptation of the human photopic oscillatory potentials: influence of the length of the dark adaptation period. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 89 (3), pps.: 267-276.

24. **Bergamasco L, Accatino A, Priano L, Neiger-Aeschbacher G, Cizinauskas S, Jaggy A (2003):** Quantitative electroencephalographic findings in beagles anaesthetized with propofol. *The Veterinary Journal*. 166 (1), pps.: 58-66.
25. **Biersdorf WR, Armington JC (1960):** Level of light adaptation and the human electroretinogram. *Journal of the Optical Society of America*. 50, pps.: 78-82.
26. **Bownds D, Dawes J, Miller J, Stahlman M (1972):** Phosphorylation of frog photoreceptor membranes induced by light. *Nature: New biology*. 24; 237(73), pps.:125-127.
27. **Boycott BB, Wässle H (1991):** Morphological classification of bipolar cells of the primate retina. *The European journal of neuroscience*. 3 (11), pps.: 1069-1088.
28. **Breton ME, Quinn GE, Schueller AW (1995):** Development of electroretinogram and rod phototransduction response in human infants. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 36(8), pps.: 1588-1602.
29. **Brigell M, Bach M, Barber C, Moskowitz A, Robson J (2003):** Guidelines for calibration of stimulus and recording parameters used in clinical electrophysiology of vision. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 107 (2), pps.: 185–193.
30. **Brindley GS, Hamasaki D (1963):** The properties and *Nature* of the R membrane of the frog's eye. *The Journal of Physiology*. 167 (3), pps.: 599-606.
31. **Brindley GS (1956):** The passive electrical properties of the frog's retina, choroid and sclera for radial fields and currents. *Journal of Physiology*. 134 (2), pps.: 339-352.
32. **Brooks DE, Komaromy AM, Kallberg ME (1999):** Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Veterinary ophthalmology*. 2 (1), pps.: 3-11.
33. **Brown KT, Wiesel TN (1961a):** Analysis of the intraretinal electroretinogram in the intact cat eye. *Journal of Physiology*. 158 (2), pps.: 229-256.
34. **Brown KT, Wiesel TN (1961b):** Localization of origins of electroretinogram components by intraretinal recording in the intact cat eye. *Journal of Physiology*. 158 (2), pps.: 257-280.
35. **Brown KT (1968):** The electroretinogram: its components and their origins. *Vision research*. 8, pps.: 633-677.
36. **Bush RA, Sieving PA (1994):** A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Investigative ophthalmology & visual science*. 35 (2), pps.: 635–645.
37. **Bush RA, Sieving PA (1996):** Inner retinal contributions to the primate photopic fast flicker electroretinogram. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*. 13 (3), pps.: 557–565.

38. **Buttery RG, Haight JR, Bell K (1990):** Vascular and avascular retinæ in mammals. A fundusoscopic and fluorescein angiographic study. *Brain, behavior and evolution*. 35 (3), pps.: 156-75.
39. **Buttery RG, Hinrichsen CFL, Weller WL, Haight JR (1991):** How thick should a retina be? A comparative study of mammalian species with and without intraretinal vasculature. *Vision Research*. 31 (2), pps.: 169-187.
40. **Byzov AL (1968):** Localization of the R-membrane in the frog eye by means of an electrode marking method. *Vision Research*. 8(6), pps.: 697-700.
41. **Cajal SR (primera publicación en 1892 en "La Cellule", Paris). Traducido por Thorpe SA, Glickstern M (1972):** The Structure of the Retina. Springfield: Charles C. Thomas Publishers: pps.: 93-153.
42. **Chen C, Tsina E, Cornwall MC, Crouch RK, Vijayaraghavan S, Koutalos Y (2005):** Reduction of all-trans retinal to all-trans retinol in the outer segments of frog and mouse rod photoreceptors. *Biophysical Journal*. 88 (3), pps.: 2278-2287.
43. **Cheng SC, Brunner EA (1981):** Inhibition of GABA metabolism in rat brain slices by halothane. *Anesthesiology*. 55 (1), pps.: 26-33.
44. **Coleman PA, Massey SC, Miller RF (1986):** Kynurenic acid distinguishes kainate and quisqualate receptors in the vertebrate retina. *Brain Research*. 27; 381 (1), pps.: 172-175.
45. **Creel, DJ, Wang, JM and Wong, KC (1987):** Transient blindness associated with transurethral resection of the prostate. *Archives of ophthalmology*. 105 (11), pps.: 1537-1539.
46. **Crouch RK, Chader GJ, Wiggert B, Pepperberg DR (1996):** Retinoids and the visual process. *Photochemistry and photobiology*. 64(4), pps.: 613-621.
47. **Cullen CL, Grahn BH (2002):** Diagnostic ophthalmology. Acute prechiasmal blindness due to sudden acquired retinal degeneration syndrome. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*. 43(9), pps.: 729-730.
48. **Dawson WW, Hazariwala K, Karges S (2000):** Human photopic response to circulating glucose. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 101 (2), pps.: 155-163.
49. **De Rouck AF (1991):** History of the electroretinogram. En *Principles and practice of clinical electrophysiology of vision*. Heckenlively JR, Arden GB (Eds.) St. Louis: Mosby Year Book. pps.: 5-13.
50. **Delaey C, Van De Voorde J (2000):** Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation (review). *Ophthalmic Research*. 32 (6), pps.: 249-256.

51. **Demant E, Nagahara K, Niemeyer G (1982):** Effects of changes in systemic blood pressure on the electroretinogram of the cat: evidence for retinal autoregulation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 23(5), pps.: 683-687.
52. **Dembinska O, Rojas LM, Varma DR, Chemtob S, Lachapelle P (2001):** Graded Contribution of Retinal Maturation to the Development of Oxygen-Induced Retinopathy in Rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 42 (5), pps.:1111-1118.
53. **Deretic D, Papermaster DS (1995):** The role of small G-proteins in the transport of newly synthesized rhodopsin. *Progress in Retinal and Eye Research*. 14 (1), pps.:249-265.
54. **Derwent JK, Linsenmeier RA (2000):** Effects of hypoxemia on the a- and b-waves of the electroretinogram in the cat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 41(11), pps.: 3634-3642.
55. **Dick E, Miller RF, Bloomfield, S (1985):** Extracellular K⁺ activity changes related to electroretinogram components. II. Rabbit (E-type) retinas. *Journal of General Physiology*. 85 (6), pps.: 911-931.
56. **Dodt, E. (1951):** Cone electroretinography by flicker. *Nature* 168 (4278): 738.
57. **Dong, C. J. & Hare, W. A. (2000):** Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third-order retinal neurons in the rabbit retina. *Vision Research* 40 (6), pps.: 579-589.
58. **Donovan WJ, Baron WS (1982):** Identification of the R–G-cone difference signal in the corneal electroretinogram of the primate. *Journal of the Optical Society of America*. 72 (8), pps.: 1014–1020.
59. **Doslak MJ (1988):** A theoretical study of the effect of silicone oil on the electroretinogram. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 29, pps.: 1881-1884.
60. **Dzoljic M, Erdmann W, DzoljicMR (1996):** Visual evoked potentials and nitrous oxide-induced neuronal depression: role for benzodiazepine receptors. *British journal of anaesthesia*. 77(4), pps.: 522–525.
61. **Edelman JL, Miller SS (1991):** Epinephrine stimulates fluid absorption across bovine retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 32(12), pps.: 3033-3040.
62. **Edwards RB (1994):** Biosynthesis of retinoic acid by Müller glial cells: A model for the central nervous system? *Progress in Retinal and Eye Research*. 13, pps.: 231-242.

63. **Einthoven W, Jolly WA (1908):** The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1 (4), pps.: 373-416.
64. **El-Maghrabi EA, Eckenhoﬀ RG (1993):** Inhibition of dopamine transport in rat brain synaptosomes by volatile anesthetics. *Anesthesiology* 78 (4), pps.: 750-756.
65. **Ernst W, Arden GB (1972):** Separation of two PIII components in the rat electroretinogram by a flicker method. *Vision Research*. 12, pps.: 1759–1763.
66. **Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y (2001):** Adaptation in Vertebrate Photoreceptors. *Physiological Reviews*. 81 (1), pps.: 117-151.
67. **Falsini B, Iarossi G, Fadda A, Porello G, Valentini P, Picardi M, Scullica, L (1999):** The fundamental and second harmonic of the photopic flicker electroretinogram: temporal frequency-dependent abnormalities in retinitis pigmentosa. *Clinical neurophysiology*. 110 (9), pps.: 1554–1562.
68. **Falsini B, Riva CE, Logean E (2002):** Flicker-evoked changes in human optic nerve blood flow: relationship with retinal neural activity. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 43(7):2309-2316.
69. **Farahbakash ZT, Hideg K, Hubbell WL (1993):** Photoactivated conformational changes in rhodopsin: a time-resolved spin label study. *Science*. 262(5138), pps.: 1416-1419.
70. **Feghali JG, Jin JC, Odom JV (1991):** Effect of short-term intraocular pressure elevation on the rabbit electroretinogram. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 32(8):2184-2189.
71. **Fish GE, Birch DG, Fuller DG (1986):** A comparison of visual function tests in eyes with maculopathy. *Ophthalmology*. 93 (9), pps.: 1177-1182.
72. **Fortune B, Bui BV, Morrison JC, Johnson EC, Dong J, Cepurna EO, Jia LJ, Barber S, Cioffi GA (2004):** Selective Ganglion Cell Functional Loss in Rats with Experimental Glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Scienc*. 45 (6), pps.: 1854-1861.
73. **François J, De Rouck A (1962):** The use of twin flashes in electroretinography. *American journal of ophthalmology*. 54, pps.: 54-63.
74. **Frayser R, Hickam JB (1964):** Retinal vascular response to breathing increased carbon dioxide and oxygen concentrations. *Investigative Ophthalmology*. 3, pps.: 427-431.
75. **Friedburg C, Allen CP, Mason PJ, Lamb TD (2004):** Contribution of cone photoreceptors and post-receptoral mechanisms to the human photopic electroretinogram. *The Journal of Physiology*. 556(3), pps.: 819-834.

76. **Frishman LJ, Steinberg RH (1989):** Light-evoked increases in $[K^+]_o$ in proximal portion of the dark-adapted cat retina. *Journal of neurophysiology*. 61 (6), pps.: 1233-1243.
77. **Frishman LJ, Viswanathan S, Robson JG (2002):** The photopic negative response of the flash ERG: changes in experimental glaucoma in monkeys and clinical applications in humans.[Engineering in Medicine and Biology, 2002. 24th Annual Conference and the Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society].Conference. Proceedings of the Second Joint, 23-26 Oct. 2002. 3, pps.: 2131- 2132.
78. **Fulton AB, Hansen RM (1988):** Scotopic stimulus/response relations of the B-wave of the electroretinogram. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 68 (3-4), pps.: 293-304.
79. **Gallego A (1971):** Células interplexiformes en la retina del gato. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. 31, pps.: 299-304.
80. **Gallemore RP, Hernandez E, Tayyanipour R, Fujii S, Steinberg RH (1993):** Basolateral membrane Cl^- and K^+ conductances of the dark-adapted chick retinal pigment epithelium. *Journal of Neurophysiology*. 70(4), pps.: 1656-68.
81. **Garhofer G, Resch H, Weigert G, Lung S, Simader C, Schmetterer L (2005):** Short-term increase of intraocular pressure does not alter the response of retinal and optic nerve head blood flow to flicker stimulation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 46(5), pps.: 1721-1725.
82. **Gotch F (1903):** The time relations of the photoelectric changes on the eyeball of the frog. *Journal of Physiology*. 29, pps.: 388-416.
83. **Gouras P, MacKay CJ (1989):** Growth in amplitude of the human cone electroretinogram with light adaptation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 30(4), pps.: 625-630.
84. **Gouras P (1984):** Color Vision. *Progress in Retinal Research*. 3, pps.: 227-261.
85. **Granit R (1933):** The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *Journal of Physiology*. 77, pps.: 207-239.
86. **Gray AT, Krejci ST, Larsson MD (1997):** Neuromuscular blocking drugs do not alter the papillary light reflex of anesthetized humans. *Archives of neurology*. 54(5), pps.: 579-84.
87. **Green DG, Kapousta-Bruneau NV (1999):** A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrode and drugs. *Visual Neuroscience*. 16, pps.: 727-741.

88. **Griff ER, Steinberg RH (1984):** Changes in apical [K⁺] produce delayed basal membrane responses of the retinal pigment epithelium in the gecko. *The Journal of general physiology*. 83(2), pps.: 193-211.
89. **Grimm C, Remé CE, Rol PO, Williams TP (2000):** Blue Light's effects on rhodopsin: photoreversal of bleaching in living rat eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 41, pps.: 3984-3990.
90. **Grimm C, Wenzel A, Williams T, Rol P, Hafezi F, Reme C (2001):** Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 42(2), pps.: 497-505.
91. **Grover S, Fishman GA, Birch DG, Locke KG, Rosner B (2003):** Variability of Full-field Electroretinogram Responses in Subjects without Diffuse Photoreceptor Cell Disease. *Ophthalmology*. 110 (6), pps.: 1159-1163.
92. **Gudermann T, Schoneberg T, Schultz G (1997):** Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annual review of neuroscience*. 20, pps.: 399-427.
93. **Gum GG, Gelatt KN, Samuelson DA (1984):** Maturation of the retina of the canine neonate as determined by electroretinography and histology. *American journal of veterinary research*. 45(6), pps.: 1166-71.
94. **Gurevich AV, Slaughter MM (1993):** Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave in the electroretinogram. *Vision Research*. 33 (17), pps.: 2431-2435
95. **Hamor RE, Gerding PA Jr, Ramsey DT, Whiteley HE, Benson GJ, Schaeffer DJ (2000):** Evaluation of short-term increased intraocular pressure on flash- and pattern-generated electroretinograms of dogs. *American journal of veterinary research*. 61(9), pps.: 1087-1091.
96. **Haskins SC (1996):** Monitoring the anesthetized patient. En *Lumb & Jones Veterinary Anesthesia*. Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ (Eds) Edición. III. pps.: 409-423.
97. **Herbert M, Vaegan, Lachapelle P (1999):** Reproducibility of ERG responses obtained with the DTL electrode. *Vision Research*. 39 (6), pps.: 1069-1070.
98. **Herron WL Jr, Riegel BW (1974):** Vitamin A deficiency-induced "rod thinning" to permanently decrease the production of rod outer segment material. *Investigative ophthalmology*. 13(1), pps.: 54-59.
99. **Hikasa Y, Ohe N, Takase K, Ogasawara S (1994):** Cardiopulmonary effects of sevoflurane in cats: comparison with isoflurane, halothane, and enflurane. *Research in veterinary science*. 63(3), pps.: 205-210.

100. **Hiroi K, Yamamoto F, Honda Y (1994):** Analysis of electroretinogram during systemic hypercapnia with intraretinal K(+)-microelectrodes in cats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 35(11), pps.: 3957-3961
101. **Hoar RM (1982):** Embryology of the eye. *Environmental health perspectives*. 44, pps.: 31-34.
102. **Holder GE (2001):** Pattern electroretinography (PERG) and an integrated approach to visual pathway diagnosis. *Progress in retinal and eye research*. 20(4), pps.: 531-561.
103. **Holder GE (1988):** Recording the pattern electroretinogram with the Arden gold foil electrode. *Journal of Electrophysiology Technologists*. 14, pps.: 183-190.
104. **Honsho C, Oria AP, Lazaro Junior LPM, Neto FD, Laus JL (2004):** The organization of flash electroretinography unit in veterinary medicine. *Ciencia Rural, Santa Maria*. 34 (4), pps.: 1097-1104.
105. **Hood DC, Greenstein VC, Holopigian K, Bauer R, Firoz B, Liebmann JM, Odel JG, Ritch R (2000):** An attempt to detect glaucomatous damage to the inner retina with the multifocal ERG. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 41 (6), pps.: 1570-1579.
106. **Howard DR, Breazile JE (1973):** Optic fiber projections to dorsal lateral geniculate nucleus in the dog. *American Journal of Veterinary Research*. 34 (3), pps.: 419-424.
107. **Huppe-Gourgues F, Coudé G, Lachapelle P, Casanova C (2005):** Effects of the intravitreal administration of dopaminergic ligands on the b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram. *Vision Research*. 45, pps.: 137-145.
108. **Ishikawa T, Yamada E (1970):** The degradation of the photoreceptor outer segment within the pigment epithelial cell of rat retina. *Journal of electron microscopy*. 19 (1), pps.: 85-99.
109. **Ishizawa Y, Pidikiti R, Liebman PA, Eckenhoff RG (2002):** G protein-coupled receptors as direct targets of inhaled anesthetics. *Molecular pharmacology*. 61 (5), pps.: 945-952.
110. **Jacobs GH, Deegan JF 2nd, Crognale MA, Fenwick JA (1993):** Photopigments of dogs and foxes and their implications for canid vision. *Visual Neuroscience*. 10(1), pps.: 173-180.
111. **Jaimes HN, Sandoval FP, Guti IH (2001):** El sistema internacional de unidades (SI). Centro Nacional de Metrología Área de Metrología Mecánica División de Metrología de Masa. Publicación Técnica CNM-MMM-PT-003.
112. **Jonas JB, Schneider U, Naumann GO (1992):** Count and density of human retinal photoreceptors. *Albrecht Von Graefe's Archive for Clinical and experimental Ophthalmology*. 230(6), pps.: 505-510.

113. **Joseph DP, Miller SS (1991):** Apical and basal membrane ion transport mechanisms in bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of Physiology*. 435, pps.: 439-463.
114. **Karwoski CJ, Proenza LM (1977):** Relationship between Muller cell responses, a local transretinal potential, and potassium flux. *Journal of neurophysiology*. 40 (2), pps.: 244-259.
115. **Karwoski CJ, Xu XJ (1999):** Current source-density analysis of light-evoked field potentials in rabbit retina. *Visual NeuroScience*. 16 (2), pps.: 369-377.
116. **Karwoski CJ, Newman EA, Shimazaki H, Proenza LM (1985):** Light-evoked increases in extracellular K⁺ in the plexiform layers of amphibian retinas. *The Journal of General Physiology*. 86 (2), pps.: 189-213.
117. **Kastrup MR, Marsico FF, Ascoli FO, Becker T, Soares JH, Gomez de Segura IA (2005):** Neuromuscular blocking properties of atracurium during sevoflurane or propofol anaesthesia in dogs. *Veterinary anaesthesia and analgesia*. 32 (4), pps.: 222-227.
118. **Kefalov VJ, Crouch RK, Cornwall MC (2001):** Role of noncovalent binding of 11-cis-retinal to opsin in dark adaptation of rod and cone photoreceptors. *Neuron*. 29 (3), pps.: 749-755.
119. **Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Versoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH (1990):** A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*. 249, pps.: 556-560.
120. **Keller C, Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Reme C (2001):** Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 42 (2), pps.: 476-480.
121. **Kline RP, Ripps H, Dowling JE (1985):** .Light-induced potassium fluxes in the skate retina. *NeuroScience*. 14, pps.: 225-235.
122. **Kline RP, Ripps H, Dowling JE (1978):** Generation of b-wave currents in the skate retina. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 75, pps.: 5727-5731.
123. **Koch SA, Rubin LF (1972):** Distribution of cones in retina of the normal dog. *American Journal of Veterinary Research*. 33 (2), pps.: 361-3.
124. **Kojima M, Zrenner E (1978):** OFF-components in response to brief light flashes in the oscillatory potential of the human electroretinogram. *Albrecht Von Graefe's Archive for Clinical and experimental Ophthalmology*. 206 (2), pps.: 107-120.
125. **Kolb H (2003):** How the retina Works. *American Scientist*. 91, pps.: 28-35.
126. **Kolb H, Nelson R, Mariani A (1981):** Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Research*. 21 (7), pps.: 1081-1114.

127. **Kolb H, West RW (1977):** Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *Journal of Neurocytology*. 6 (2), pps.: 155-170.
128. **Kolb H (1970):** Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 258 (823), pps.: 261-283.
129. **Komaromy AM, Andrew SE, Sapp Jr HL, Brooks DE, Dawson WW (2003):** Flash electroretinography in standing horses using the DTL™ microfiber electrode. *Veterinary Ophthalmology*. 6 (1), pps.: 27–33.
130. **Komaromy AM, Brooks DE, Dawson WW, Källberg ME, Ollivier FJ, Ofri R (2002):** Technical issues in electrodiagnostic recording. *Veterinary Ophthalmology*. 5 (2), pps.: 85–91.
131. **Komaromy AM, Smith PJ, Brook DE (1998):** Electroretinography in dogs and cats. *Part II. Technique, Interpretation and Indications. Compendium of Continuing Education for the practicing Veterinarian*. 20, pps.: :355-366.
132. **Kommonen B, Dawson WW, Parmer R (1991):** Pigment epithelial function in canine retina. *American Journal of Veterinary Research*. 52, pps.: 1341–1344.
133. **Kommonen B, Karhunen U, Raitta C (1988):** Effects of thiopentone halothane-nitrous oxide anaesthesia compared to ketamine-xylazine anaesthesia on the DC recorded dog electroretinogram. *Acta veterinaria Scandinavica*. 29(1), pps.: 23-33.
134. **Kommonen B, Raitta C (1987):** Electroretinography in Labrador retrievers given ketamine-xylazine anesthesia. *American Journal of Veterinary Research*. 48(9), pps.: 1325-31.
135. **Kommonen B (1988):** The DC-ecorded dog electroretinogram in ketamine-medetomidine anaesthesia. *Acta veterinaria Scandinavica*. 29 (1), pps.: 35-41.
136. **Kondo M, Wang L, Bill A (1997):** The role of nitric oxide in hyperaemic response to flicker in the retina and optic nerve in cats. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 75 (3), pps.: 232–235.
137. **Kondo M, Sieving PA (2002):** Post-photoreceptor activity dominates primate photopic 32-Hz ERG for sine-, square-, and pulsed stimuli. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 43 (7), pps.: 2500-2507.
138. **Kondo M, Sieving PA (2001):** Primate photopic sine-wave flicker ERG: vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 42(1), pps.: 305-312.
139. **Kouyama N, Marshak DW (1992):** Bipolar cells specific for blue cones in the macaque retina. *Journal of NeuroScience*. 12 (4), pps.: 1233-1252.

140. **Lachapelle PA (1990):** Possible contribution of the optic nerve to the photopic oscillatory potentials. *Clinical Vision Science*. 5, pps.: 421–426.
141. **Larsson MD, Sessler DI, Washington DE, Merrifield BR, Hynson JA, McGuire J (1993):** Pupillary response to noxious stimulation during isoflurane and propofol anesthesia. *Anesthesia and Analgesia*. 76 (5), pps.: 1072-1078.
142. **Larsson J, Bauer B, Andréasson S (2000):** The 30-Hz flicker cone ERG for monitoring the early course of central retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmológica Scandinava*. 78 (2), pps.: 187–190.
143. **Larsson J, Bauer B, Cavallin-Sjöberg U, Andreasson S (1998):** Fluorescein angiography versus ERG for predicting the prognosis in Central Retinal Vein Occlusion. *Acta Ophthalmológica Scandinava*. 76 (4), pps.: 456–460.
144. **Lassen NA (1959):** Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiological reviews*. 39(2), pps.: 183-238.
145. **Lazard P, Rigaudière F, Rosolen SG, Règnier A (2000):** Électrophysiologie oculaire. *Encyclopédie Vétérinaire (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris) Ophthalmologie*, 1700, 26 p.
146. **Lei B, Perlman I (1999):** The contribution of voltage- and time-dependent potassium conductances to the electroretinogram in rabbits. *Visual NeuroScience*. 16, pps.: 743-754.
147. **Lesiuk TP, Braekevelt CR (1983):** Fine structure of the canine tapetum lucidum. *Journal of Anatomy*. 136, pps.: 157–164.
148. **Lessel MR, Thaler A, Scheiber V, Heilig P (1993):** The dark trough in clinical electro-oculography. Influence of preadaptation on amplitudes and latencies. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 84(1), pps.: 31-38.
149. **Linsenmeier RA, Mines AH, Steinberg RH (1983):** Effects of hypoxia and hypercapnia on the light peak and electroretinogram of the cat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 24(1), pps.: 37-46.
150. **Linsenmeier RA, Steinberg RH (1984a):** Delayed basal hyperpolarization of cat retinal pigment epithelium and its relation to the fast oscillation of the DC electroretinogram. *The Journal of General Physiology*. 83(2), pps.: 213-232.
151. **Linsenmeier RA, Steinberg RH (1984b):** Effects of hypoxia on potassium homeostasis and pigment epithelial cells in the cat retina. *The Journal of General Physiology*. 84(6), pps.: 945-970.

152. **Macaluso C, Onoe S, Niemeyer G (1992):** Changes in glucose level affect rod function more than cone function in the isolated, perfused cat eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 33 (10), pps.: 2798-2808.
153. **Maeda T, Van Hooser JP, Driessen CA, Filipek S, Janssen JJ, Palczewski K (2003):** Evaluation of the role of the retinal G protein-coupled receptor (RGR) in the vertebrate retina in vivo. *Journal of neurochemistry*. 85(4), pps.: 944-956.
154. **Maffei L, Fiorentini A, Bisti S, Hollander H (1985):** Pattern ERG in the monkey after section of the optic nerve. *Experimental brain research*. 59 (2), pps.: 423-425.
155. **Maffei L, Fiorentini A (1981):** Electroretinographic responses to alternating gratings before and after section of the optic nerve. *Science*. 211 (4485), pps.: 953-955.
156. **Mangel SC (1991):** Analysis of the horizontal cell contribution to the receptive field surround of ganglion cells in the rabbit retina. *The Journal of physiology*. 442, pps.: 211-234.
157. **Marcus M, Cabel L, Marmor MF (2004):** Are circadian variations in the electroretinogram evident on routine testing? *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 108(2), pps.: 165-169.
158. **Marmor MF (1991):** Clinical electrophysiology of the retinal pigment epithelium. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 76(4), pps.: 301-313.
159. **Marmor MF (1998):** Standardization notice: EOG standard reapproved. Electro-oculogram *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 95 (1), pps.: 91-92.
160. **Marmor MF, Holder GE, Seeliger MW, Tamamoto S (2004):** Standard for clinical electroretinography. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 108 (2), pps.: 107-114.
161. **Marmor MF, Hood DC, Keating D, Kondo M, Seeliger MW, Miyake Y (2003):** Guidelines for basic multifocal electroretinography (mfERG). *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 106 (2), pps.: 105-115.
162. **Martin E, Redondo JI, Molleda JM, Santisteban JM, Lopez R, Gomez-Villamandos R (2001):** Effects of sevoflurane, isoflurane and halotane anaesthesia on fluorescein angiographic phases of dogs: a comparative study. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*. 48(5), pps.: 267-275.
163. **Massey SC (1990):** Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Progress in retinal research*. 9, pps.: 399-425.

164. **Mata N, Radu R, Clemmons R, G. Travis G (2000):** Isomerization and Oxidation of Vitamin A in Cone-Dominant Retinas A Novel Pathway for Visual-Pigment Regeneration in Daylight. *Neuron*. 36 (1), pps.: 69-80.
165. **Mc Murphy RM, Davidson HJ, Hodgson DS (2004):** Effects of atracurium on intraocular pressure, eye position, and blood pressure in eucapnic and hypocapnic isoflurane-anesthetized dogs. *American journal of veterinary research*. 65(2), pps.: 179-182.
166. **Mc Donnell W (1996):** Respiratory system. En *Lumb & Jones Veterinary Anesthesia* Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ (Eds). Edición. III, pps.: 115-147.
167. **Mentzer AE, Eifler DM, Montiani-Ferreira F, Tuntivanich N, Forcier JQ, Petersen-Jones SM (2005):** Influence of Recording Electrode Type and Reference Electrode Position on the Canine Electroretinogram. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 111 (2), pps.: 95-106.
168. **Miller PE, Murphy CJ (1995):** Vision in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 207(12), pps.: 1623-1634.
169. **Miller SS, Edelman JL (1990):** Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of Physiology*. 424, pps.: 283-300.
170. **Miller WW, Albert RA, Boosinger TR, Holloway CL, Simpson ST, Tojvio-Kinnucan MA (1989):** Postnatal development of the photoreceptor inner segment of the retina in dogs. *American journal of veterinary research*. 50(12), pps.: 2089-2092.
171. **Miller RF (1973):** Role of K^+ in generation of b-wave of electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*. 36, pps.: 28-35.
172. **Miller RF, Dowling JE (1970):** Intracellular responses of the Muller (glial) cells of the mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*. 33(3), pps.: 323-341.
173. **Mirakhur RK, Elliott P, Shepherd WF, McGalliard JN (1990):** Comparison of the effects of isoflurane and halothane on intraocular pressure. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 34(4):282-285.
174. **Mittag TW, Danias J, Pohorenc G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM, Tatton WG (2000):** Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 41(11), pps.: 3451-3459.
175. **Montiani-Ferreira F, Cardoso FF, Peterson-Jones S (2004):** Basic concepts in statistics for veterinary ophthalmologists. *Veterinary Ophthalmology*. 7(2), pps.: 79-85.

176. **Mora JC, Aregall MC (2005):** Pruebas electrofisiológicas: ¿qué, cuando, cómo y por qué?. *Annals d'Oftalmologia*. 13(1), pps.: 8-29.
177. **Murakami M, Kaneko A (1966):** Subcomponents of P3 in cold-blooded vertebrate retinae. *Nature*. 210(31), pps.: 103-104.
178. **Murakami M, Pak WL (1970):** Intracellularly recorded early receptor potential of the vertebrate photoreceptors. *Vision Research*. 10(10), pps.: 965-975.
179. **Mutoh T, Nishimura R, Kim HY, Matsunaga S, Sasaki N (1997):** Cardiopulmonary effects of sevoflurane, compared with halothane, enflurane, and isoflurane, in dogs. *American journal of veterinary research*. 58(8), pps.: 885-890.
180. **Nagahama S, Nishimura R, Mochizuki M, Sasaki N (2006):** The effects of propofol, isoflurane and sevoflurane on vecuronium infusion rates for surgical muscle relaxation in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 33(3), pps.: 169-174.
181. **Nagaoka T, Sakamoto T, Mori F, Sato E, Yoshida A (2002):** The effect of nitric oxide on retinal blood flow during hypoxia in cats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 43(9), pps.: 3037-3044.
182. **Nakaigawa Y, Akazawa S, Shimizu R, Ishii R, Yamato R (1995):** Effects of graded infusion rates of propofol on cardiovascular haemodynamics, coronary circulation and myocardial metabolism in dogs. *British Journal of Anaesthesia*. 75(5), pps.: 616-621.
183. **Nakanishi S (1992):** Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 258(5082), pps.: 597-603.
184. **Nakanishi S (1994):** Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron*. 13(5), pps.: 1031-1037.
185. **Narahashi T, Moore JW, Scott WR (1964):** Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *The Journal of general physiology*. 47, pps.: 965-974.
186. **Narahashi T (1974):** Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiological reviews*. 54(4), pps.: 813-889.
187. **Narfström K, Ekestén B (1999):** Diseases of the canine ocular fundus. En *Veterinary Ophthalmology*, 3rd edición, KN. Gelatt (Ed.), Lea & Febiger, Philadelphia pps.: 869-934.
188. **Narfstrom K, Andersson BE, Andreasson S, Gouras P (1995):** Clinical electroretinography in the dog with ganzfeld stimulation: a practical method of examining rod and cone function. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 90(3), pps.: 279-90.

189. **Narfström K, Ekestén B, Rosolen SG, Spiess BM, Percicot CL, Ofri R (2002):** Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 105(2), pps.: 83–92.
190. **Narfström K, Wrigstad A (1999):** Clinical, electrophysiological and morphological changes in a case of hereditary retinal degeneration in the Papillon dog. *Veterinary Ophthalmology*. 2(1), pps.: 67-74.
191. **Narfström K (2002):** Electroretinography in veterinary medicine – easy or accurate? *Veterinary Ophthalmology*. 5 (4), pps.: 249–251.
192. **Neitz J, Geist T, Jacobs GH (1989):** Color vision in the dog. *Visual Neuroscience*. 3(2), pps.: 119-125.
193. **Newman EA, Odette LL (1984):** Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. *Journal of neurophysiology*. 51(1), pps.: 164-182.
194. **Newman EA (1986):** Physiological properties and possible functions of Muller cells. *Neuroscience research. Supplement*. 4, pps.: S209-220.
195. **Newman EA (1989):** Potassium conductance block by barium in amphibian Müller cells. *Brain Research*. 498(2), pps.: 308-314.
196. **Newman EA (1980):** Current source-density analysis of the b-wave of frog retina. *Journal of Neurophysiology*. 43(5), pps.: 1355-1366.
197. **Niemeyer G, Nagahara K, Demant E (1982):** Effects of changes in arterial PO₂ and PCO₂ on the electroretinogram in the cat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 23(5), pps.: 678-683.
198. **Niemeyer G, Steinberg RH (1981):** Effects of low pH and high CO₂ on the b-wave and light peak of the DC ERG in the perfused cat eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 20 (ARVO suppl.), 43.
199. **Nilsson SE (1971):** Human retinal vascular obstructions. A quantitative correlation of angiographic and electroretinographic findings. *Acta Ophthalmologica*. 49(1), pps.: 111-133.
200. **Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S (1966):** Retinal damage by light in rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 5(5), pps.: 450–473.
201. **Noell WK (1954):** The origin of the electroretinogram. *American Journal of Ophthalmology*. 38(1:2), pps.: 78-90.
202. **Norren DV, Padmos P (1975):** Cone dark adaptation: the influence of halothane anesthesia. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 14(3), pps.: 212-227.

203. **Norren DV, Padmos P (1977):** Influence of anesthetics, ethyl alcohol, and Freon on dark adaptation of monkey cone ERG. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 16(1), pps.: 80-83.
204. **Novack GD (1997):** Ocular toxicology. *Current opinion in ophthalmology*. 8(6), pps.: 88-92.
205. **Oakley B 2nd (1977):** Potassium and the photoreceptor-dependent pigment epithelial hyperpolarization. *The Journal of general physiology*. 70(4), pps.: 405-425.
206. **Oakley BI, Green DG (1976):** Correlation of light-induced changes in retinal extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*. 39(5), pps.: 1117-1133.
207. **Odom JV, Bach M, Barber C, Brigell M, Marmor MF, Tormene AP, Holder GE, Vaegan (2004):** Visual Evoked Potentials Standard (2004). *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 108(2), pps.: 115-123
208. **Ofri R (2002):** Clinical electrophysiology in veterinary ophthalmology--the past, present and future. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 104(1), pps.: 5-16.
209. **Ollivier FJ, Samuelson DA, Brooks DE, Lewis PA, Kallberg ME, Komaromy AM (2004):** Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Veterinary Ophthalmology*. 7(1), pps.: 11-22.
210. **Papakostopoulos D, Bloom PA, Grey RH, Dean Hart JC (1992):** The electro-oculogram in central retinal vein occlusion. *British Journal of Ophthalmology*. 76(9), pps.: 515-519.
211. **Papermaster DS, Schneider BG, Besharse JC (1985):** Vesicular transport of newly synthesized opsin from the Golgi apparatus toward the rod outer segment. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 26(19), pps.: 1386-1404.
212. **Parisi V, Miglior S, Manni G, Centofanti M, Bucci MG (2006):** Clinical Ability of Pattern Electroretinograms and Visual Evoked Potentials in Detecting Visual Dysfunction in Ocular Hypertension and Glaucoma. *Ophthalmology*. 113(2), pps.: 216-228.
213. **Paupoo AA, Mahroo OA, Friedburg C, Lamb TD (2000):** Human cone photoreceptor responses measured by the electroretinogram [correction of electroretinogram] a-wave during and after exposure to intense illumination. *The Journal of Physiology*. 529 (2), pps.: 469-482.
214. **Peachey NS, Alexander KR, Derlacki DJ, Bobak P, Fishman GA (1991):** Effects of light adaptation on the response characteristics of human oscillatory potentials. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 78(1), pps.: 27-34.

215. **Peachey NS, Alexander KR, Fishman GA (1989):** The luminance-response function of the dark-adapted human electroretinogram. *Vision Research*. 29(3), pps.: 263-270.
216. **Pepperberg DR, Brown PK, Lurie M, Dowling JE (1978):** Visual pigment and photoreceptor sensitivity in the isolated skate retina. *Journal of General Physiology*. 71, pps.: 369-396.
217. **Perlman I (1983):** Relationship between the amplitudes of the b wave and the a wave as a useful index for evaluating the electroretinogram. *British Journal of Ophthalmology*. 67(7), pps.: 443-448.
218. **Petounis AD, Chondreli S, Vadaluka-Sekioti A (1980):** Effect of hypercapnea and hyperventilation on human intraocular pressure general anaesthesia following acetazolamide administration. *British Journal of Ophthalmology*. 64(6), pps.: 422-425.
219. **Ponjavic V, Gränse L, Kjoellström S, Andréasson S, Bruun A (2004):** Alterations in electroretinograms and retinal morphology in rabbits treated with vigabatrin. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 108(2), pps.: 125-133.
220. **Racine J, Joly S, Rufiange M, Rosolen S, Casanova C, Lachapelle P (2005):** The photopic ERG of the albino guinea pig (*Cavia porcellus*): a model of the human photopic ERG. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 110(1), pps.: 67-77.
221. **Raitta C, Karhunen U, Seppalainen AM, Naukkarinen M (1979):** Changes in the electroretinogram and visual evoked potentials during general anaesthesia. *Albrecht Von Graefe's Archive for Clinical and experimental Ophthalmology*. 211(2), pps.: 139-144.
222. **Rangaswamy NV, Frishman LJ, Dorotheo EU, Schiffman JS, Bahrani HM, Tang RA (2004):** Photopic ERGs in patients with optic neuropathies: comparison with primate ERGs after pharmacologic blockade of inner retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 45(10), pps.: 3827-3837.
223. **Rapaport DH, Stone J (1984):** The area centralis of the retina in the cat and other mammals: focal point for function and development of the visual system. *NeuroScience*. 11(2), pps.: 289-301.
224. **Raz D, Seeliger MW, Geva AB, Percicot CL, Lambrou GN, Ofri R (2002):** The effect of contrast and luminance on mfERG responses in a monkey model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 43(6), pps.: 2027-2035.
225. **Raz-Prag D, Machida S, Fariss RN, Vijayasarathy C, Bush RA, Sieving PA (2004):** Origins of the Photopic Negative Response in Rat Retinal Degeneration Models (abstract n° 21). *Veterinary Ophthalmology*. 7(6), pps.: 437-453.

226. **Riva CE, Sinclair SH, Grunwald JE (1981):** Autoregulation of retinal circulation in response to decrease of perfusion pressure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 21(1), pps.: 34-38.
227. **Riva CE., Harino S, Shonat RD, Petrig BL (1991):** Flicker evoked increase in optic nerve head blood flow in anesthetized cats. *Neuroscience Letters*. 128(2), pps.: 291–296.
228. **Robson JG, Frishman LJ (1996):** Photoreceptor and bipolar cell contributions to the cat electroretinogram: a kinetic model for the early part of the flash response. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*. 13(3), pps.: 613-622.
229. **Robson JG, Saszik SM, Ahmed J, Frishman LJ (2003):** Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque. *The Journal of Physiology*. 547 (2), pps.: 509-530.
230. **Rodriguez-Peralta L (1975):** The blood-aqueous barrier in five species. *American journal of ophthalmology*. 80(4), pps.: 713-725.
231. **Rosolen SG, Rigaudiere F, Lazard P, Saint-Macary G, Le Gargasson JF (1998):** New sclero-conjunctival electrodes and contention device for clinical ERG recording on dog and cat. Poster 36th ISCEV Hradec Králové, Czech Republic
232. **Rosolen SG, Chalier C, Rigaudiere F, Lachapelle P (2005a):** The ERG of the Beagle Dog: Evidence Associating a Post b-wave Negativity with the Tapetum Lucidum. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 110(2-3), pps.: 145-153
233. **Rosolen SG, Chalier C, Rigaudière F, LeGargasson J-F (2004a):** The photopic flickering ERG: what are we testing? Abstract 32, *Veterinary Ophthalmology*. 7, pps.: 425–435
234. **Rosolen SG, Chalier C, Rigaudière F, Saucet JC, Lachapelle P, LeGargasson JF (2005b):** Photopic ERGs in selected animal species: Evidence for a possible contribution of the tapetum lucidum. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46:E-Abstract 2256.
235. **Rosolen SG, Charlier C, Rigaudière F, Le Gargasson JF (2005c):** Correlating glycemia with the photopic ergs in cynomolgus monkey. *Abstracts: European College of Veterinary Ophthalmologists and European Society of Veterinary Ophthalmology*, Oporto, Portugal, 15–19 June 2005
236. **Rosolen SG, Lazard P (1997):** Comparison between humans and non sedated micropigs ERGs during dark adaptation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 38(4), pps.: S887.
237. **Rosolen SG, Lazard P, Rigaudiere F (1997):** Exploration indirecte du fonctionnement de l'épithélium pigmenté par électrorétinographie chez le macaque rhésus (*Macaca mulatta*). *Ophthalmologie*. 11, pps.: 359-364.

238. **Rosolen SG, Rigaudière F, Lachapelle P (2002):** A practical method to obtain reproducible binocular electroretinograms in dogs. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 105(2), pps.: 93–103.
239. **Rosolen SG, Rigaudière F, Lazard P (1999):** Variability at photopic ERG wave components on normal dog. *Abstracts: 30th Annual meeting of the American college of veterinary ophthalmologists*. Chicago, USA, n° 57.
240. **Rosolen SG, Rigaudière F, Le Gargasson JF, Brigell MG (2005d):** Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 110(1), pps.: 57–66.
241. **Rosolen SG, Rigaudière F, LeGargasson JF, Chalier C, Rufiange M, Racine J, Joly S, Lachapelle P (2004b):** Comparing the photopic ERG i-wave in different species. *Veterinary Ophthalmology*. 7(3), pps.: 189-192.
242. **Rosolen SG, Rigaudière F, Saint-Macary G (2003):** A new animal model of hyperpressure-induced glaucoma using the minipig. *Journal Français D'ophtalmologie*. 26 (3), pps.: 259–267
243. **Rousseau S, Lachapelle P (2000):** Transient enhancing of cone electroretinograms following exposure to brighter photopic backgrounds. *Vision Research*. 40(8), pps.: 1013–1018.
244. **Rousseau S, McKerral M, Lachapelle P (1996):** The i-wave: bridging flash and pattern electroretinography. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology. Supplement*. 46, pps.: 165-171.
245. **Rubin LF, Wolfes RL (1962):** Mydriatics for veterinary ophthalmoscopy. *Journal of the American animal hospital association*. 140, pps.: 137-141.
246. **Rufiange M, Dassa J, Dembinska O, Koenekoop RK, Little JM, Polomeno RC, Dumont M, Chemtob S, Lachapelle P (2003):** The photopic ERG luminance-response function (Photopic Hill): Method of analysis and clinical application. *Vision Research*. 43(12), pps.: 1405–1412.
247. **Rufiange M, Dumont M, Lachapelle P (2002a):** Correlating retinal function with melatonin secretion in subjects with an early or late circadian phase. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 43(7), pps.: 2491–2499.
248. **Rufiange M, Dumont M, Lachapelle P (2005):** Modulation of the human photopic ERG luminance-response function with the use of chromatic stimuli. *Vision Research*. 45(17), pps.: 2321-2330.

249. **Rufiange M, Rousseau S, Dembinska O, Lachapelle P (2002b):** Cone-dominated ERG luminance-response function: the Photopic Hill revisited. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 104(3), pps.: 231–248.
250. **Samuelson DA (1999):** Ophthalmic Anatomy. En *Veterinary Ophthalmology*, 3rd edición, KN. Gelatt (Ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, pps.: 31-150.
251. **Sasaki S, Nakayama N, Nakanishi Y, Kurihara A, Nakamura I, Kimura M, Tarumoto (1998):** Pattern reversal visual evoked potential (P-VEP) and pattern reversal electroretinogram (P-ERG) in beagles. *Toxicology Letters*, 95 (1), pps.: 171-172.
252. **Saszik SM, Robson JG, Frishman LJ (2002):** The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *Journal of Physiology*. 543 (3), pps.: 899-916.
253. **Sato E, Sakamoto T, Nagaoka T, Mori F, Takakusaki K, Yoshida A (2003):** Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow during hypercapnia in cats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 44(11), pps.: 4947-4953.
254. **Sato H, Fukuda N, Kuriki H, Maki Y, Nomura M, Saji Y, Nagawa Y (1980):** A procedure for recording electroretinogram (ERG) in conscious monkeys, and effects of some drugs. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 76(7), pps.: 581-594.
255. **Sato S, Sugimoto S, Chiba S. (1982):** A procedure for recording electroretinogram and visual evoked potential in conscious dogs. *Journal of pharmacological methods*. 8(3), pps.: 173-181.
256. **Schlame M, Hemmings HC junior (1995):** Inhibition by volatile anesthetics of endogenous glutamate release from synaptosomes by a presynaptic mechanism. *Anesthesiology*. 82(6), pps.: 1406-1416.
257. **Schnitzer J (1988):** Astrocytes in mammalian retina. *Progress in retinal research*. 7, pps.: 209-231.
258. **Sharpe LT, Stockman A (1999):** Rod pathways: the importance of seeing nothing. *Trends in neurosciences*. 22(11), pps.: 497-504.
259. **Sieving PA, Murayama Y, Naarendrop F (1991):** Monkey cone ERG b-wave results from interaction of depolarizing and hyperpolarizing pathways. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 32, pps.: 927.
260. **Sieving PA, Murayama Y, Naarendrop F (1994):** Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: A role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Visual Neuroscience*. 11(3), pps.: 519-532.

261. **Sieving PA, Nino C (1988):** Scotopic threshold response (STR) of the human electroretinogram. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 29(11), pps.: 1608-1614.
262. **Sieving PA (1993):** Photopic ON- and OFF-pathway abnormalities in retinal dystrophies. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 91, pps.: 701-773.
263. **Sims MH (1999):** Electrodiagnostic evaluation of vision. En: *Veterinary Ophthalmology* 3rd edición Gelatt KN(Ed), Lippincott-Lea & Febiger, Philadelphia. 483–507.
264. **Slaughter MM, Miller RF (1981):** 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science*. 211(4478), pps.: 182–185.
265. **Slaughter MM, Miller RF (1983a):** An excitatory amino acid antagonist blocks cone input to sign-conserving second-order retinal neurons. *Science*. 219 (4589), pps.: 1230–1232.
266. **Slaughter MM, Miller RF (1983b):** The role of excitatory amino acid transmitters in the mudpuppy retina: an analysis with kainic acid and N-methyl aspartate. *The Journal of neuroscience*. 3(8), pps.: 1701-1711.
267. **Sloan TB (1998):** Anesthetic effects on electrophysiologic recordings. *Journal of clinical neurophysiology*. 15(3), pps.: 217-226.
268. **Steffey EP (1996):** Inhalation Anesthetics. En *Lumb & Jones Veterinary Anesthesia* Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ (Eds) Edición. III. pps.: 297-329.
269. **Steinberg RH (1985):** Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 60(4), pps.: 327-346.
270. **Steinberg RH, Reid M, Lacy PL (1973):** The distribution of rods and cones in the retina of the cat (*Felis domesticus*). *The Journal of comparative neurology*. 148(2), pps.: 229-248.
271. **Steinberg RH, Schmidt R, Brown KT (1970):** Intracellular responses to light from cat pigment epithelium: origin of the electroretinogram c-wave. *Nature*. 227(5259), pps.: 728-730.
272. **Steinberg RH, Fisher SK, Anderson DH (1980):** Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *The Journal of comparative neurology*. 190(3), pps.: 501-518.
273. **Stockton RA, Slaughter MM (1989):** B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *The Journal of General Physiology*. 93(1), pps.: 101-122.
274. **Stryer L (1991):** Visual excitation and recovery. *The Journal of biological chemistry*. 266(17), pps.: 10711-10714.
275. **Taylor WR, Smith RG (2004):** Transmission of scotopic signals from the rod to rod-bipolar cell in the mammalian retina. *Vision Research*. 44(28), pps.: 3269-3276.

276. **Theischen M, Schilling H, Steinhorst UH (1997):** EOG in adult vitelliform macular degeneration, butterfly-shaped pattern dystrophy and Best disease. *Ophthalmologie*. 94(3), pps.:230-233.
277. **Tomita T, Murakami M, Hashimoto Y (1960):** On the R membrane in the frog's its localization, and relation to the retinal action potential eye. *The Journal of general physiology*. 43(6), pps.: 81-94.
278. **Tremblay F, Parkinson JE (2003):** Alteration of electroretinographic recordings when performed under sedation or halogenate anesthesia in a pediatric population. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 107(3), pps.:271–279.
279. **Tso MO, Friedman E (1967):** The retinal pigment epithelium. I. comparative histology. *Archives of Ophtalmology*. 78(5), pps.: 641-649.
280. **Tuntivanich N, Mentzer AL, Eifler DM, Montiani-Ferreira F, Forcier JQ, Johnson CA, Peterson-Jones SM (2005):** Assessment of the dark adaptation time required for recovery of electroretinographic responses in dogs after fundus photography and indirect ophthalmoscopy. *American Journal of Veterinary Research*. 66(10), pps.: 1798-1804
281. **Ueno S, Kondo M, Niwa Y, Terasaki H, Miyake Y (2004):** Luminance Dependence of Neural Components that Underlies the Primate Photopic Electroretinogram. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 45 (3), pps.: 1033-1040.
282. **Ueno S, Kondo M, Ueno M, Miyata K, Terasaki H, Miyake Y (2006):** Contribution of retinal neurons to d-wave of primate photopic electroretinograms. *Vision Research*. 46(5), pps.: 658-664.
283. **Vadala M, Anastasi M, Lodato G, Cillino S (2002):** Electroretinographic oscillatory potentials in insulin-dependent diabetes patients: a long-term follow-up. *Acta ophthalmologica Scandinavica*.80(3), pps.: 305–309.
284. **Vaegan (2002):** Animal models of clinical electrophysiology of vision. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 104(1), pps.: 1-3.
285. **Venturini CM, Knowles RG, Palmer RM, Moncada S (1991):** Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. *Biochemical and biophysical research communications*. 180(2), pps.: 920–925.
286. **Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991):** Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science*. 252(5013), pps.: 1715-1718.

287. **Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Harwerth RS, Smith EL III (1999):** The photopic negative response of the macaque electroretinogram: reduction by experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 40(6), pps.: 1124–1136.
288. **Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Walters JW (2001):** The Photopic Negative Response of the Flash Electroretinogram in Primary Open Angle Glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 42(2), pps.: 514-522.
289. **Viswanathan S, Frishman LJ (1997):** Evidence that negative potentials in the photopic electroretinograms of cats and primates depend upon spiking activity of retinal ganglion cell axons. *Abstracts - Society for Neuroscience*. 23, pps.: 1024.
290. **Vogel M (1978):** Postnatal development of the cat's retina. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 54(4), pps.: 1-66.
291. **Wachtmeister L (1998):** Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Progress in Retinal and Eye Research*. 17(4), pps.: 485–521
292. **Wakabayashi K, Gieser J, Sieving PA (1988):** Aspartate separation of the scotopic threshold response (STR) from the photoreceptor a-wave of the cat and monkey ERG. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 29(11), pps.: 1615-1622.
293. **Wali N, Leguire LE (1989):** On the method for fitting the Naka-Rushton equation: corrections to Aylward. *Clinical Visual Science*. 6, pps.: 79.
294. **Wali N, Leguire LE (1993):** Fundus pigmentation and the electroretinographic luminance-response function. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 84(1), pps.: 61–69.
295. **Wali N, Leguire LE (1992):** The photopic hill: a new phenomenon of the light adapted electroretinogram. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 80 (4), pps.: 335–342.
296. **Walther G, Hellner KA (1986):** Early receptor potential recordings for clinical routine. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*. 62(1), pps.: 31-39.
297. **Wässle H, Boycott BB (1991):** Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews*. 71(2), pps.: 447-480.
298. **Watcha MF, Chu FC, Stevens JL, Forestner JE (1990):** Effects of halothane on intraocular pressure in anesthetized children. *Anesthesia and Analgesia*. 71(2), pps.: 181-184.
299. **Weaver BMQ, Raptopoulos D (1990):** Induction of anaesthesia in dogs and cats with propofol. *Veterinary Record*. 126(25), pps.: 617-620.

-
300. **Wiebe V y Hamilton P (2002):** Fluoroquinolone induced retinal degeneration in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 221(11), pps.: 1568-1571.
301. **Witkovsky, P., Dudek, E. F. & Ripps, H. (1975):** Slow P-III component of the carp electroretinogram. *Journal of General Physiology*. 65(2), pps.: 119-134.
302. **Wongpichedchai S, Hansen RM, Koka B, Gudas VM, Fulton AB (1992):** Effects of halothane on childrens electroretinograms. *Ophthalmology*. 99(8), pps.: 1309-1312.
303. **Xu XJ, Xu J, Huang B, Livsey CT, Karwoski CJ (1991):** Comparison of pharmacological agents (aspartate vs. aminophosphonobutyric plus kynurenic acids) to block synaptic transmission from retinal photoreceptors in frog. *Experimental eye research*. 52(6), pps.: 691-698.
304. **Xu, XJ, Karwoski, C (1995):** Current source density analysis of the electroretinographic d wave of frog retina. *Journal of Neurophysiology*. 73(6), pps.: 2459-2469.
305. **Yanase J, Ogawa H (1996):** Effects of halothane and sevoflurane on the electroretinogram of dogs. *American journal of veterinary research*. 58(8), pps.: 904-909.
306. **Yanase J, Ogawa H y Ohtsuka H (1995):** Rod and cone components in the dog electroretinogram during and after dark adaptation. *The Journal of veterinary medical science*. 57(5), pps.: 877-881.
307. **Yanase J, Ogawa H y Ohtsuka H (1996):** Scotopic threshold response of the electroretinogram of dogs. *Annual review of neuroscience*. 57(3), pps.: 361-366.
308. **Yau KW, Baylor DA (1989):** Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annual review of neuroscience*. 12, pps.: 289-327.
309. **Yau KW, Nakatani K (1984):** Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment. *Nature*. 311(5987):661-663.
310. **Yau KW (1984):** Phototransduction mechanisms in retinal rods and cones. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 35(1), pps.: 9-32.
311. **Young RW.** The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *The Journal of Cell Biology*. 49, pps.:303-318.

**EFFECTO DE LA ANESTESIA INHALATORIA CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO
SOBRE EL ELECTRORETINOGRAMA EN EL PERRO: NORMOCAPNIA E
HIPERCAPNIA**

RESÚMENES

IX.- RESÚMENES.-

1.- RESUMEN:

Con el presente trabajo, hemos estudiado los efectos que provocan sobre el ERG dos de los anestésicos inhalatorios más utilizados en veterinaria, el isoflurano y el sevoflurano. Asimismo, nos propusimos valorar la influencia sobre el ERG de dichos anestésicos en situación de normocapnia e hipercapnia. Para ello, hemos elegido un protocolo de electrorretinografía de reciente publicación que incluye la función luminancia-respuesta en condiciones fotópicas (“photopic hill”), el adaptó-electrorretinograma (AERG), el single flash y el ERG flicker con 4 frecuencias temporales de estímulo distintas (6, 12, 20 y 30 Hz). Este protocolo fue realizado a 6 perros sanos de raza beagle bajo 4 situaciones anestésicas distintas constituyendo así 4 grupos bien diferenciados a los que llamamos ISON, ISOH, SEVON y SEVOH. Los grupos ISON e ISOH se realizaron con isoflurano en situación de normocapnia e hipercapnia respectivamente, el grupo SEVON se realizó con sevoflurano en normocapnia y por último el grupo SEVOH se realizó con sevoflurano en hipercapnia.

En los perros de los grupos hipercápnicos (ISOH y SEVOH) Hemos observado una significativa reducción en la amplitud de la *onda b* del Imax (Vmax), y en la de la *onda b* del minuto 32 del AERG (respuesta pura de bastones). Por lo contrario, la amplitud de la *onda a* del Imax (Amax) no sufrió cambios significativos entre los 4 grupos. Por otra parte, el flicker de 6 Hz tuvo una amplitud significativamente menor en los grupos hipercápnicos, mientras que la amplitud de los ERGs flicker de mayor frecuencia temporal (12, 20 y 30 Hz) no se modificó. El tiempo de culminación del flicker de 30 Hz fue mayor en los grupos sometidos a hipercapnia. En base a los resultados obtenidos, creemos que a las intensidades de estímulo utilizadas en este experimento, la *onda a* del electrorretinograma del perro reflejó fundamentalmente la actividad de las vías OFF, y estas no se alteraron de manera significativa con la hipercapnia. Por lo contrario, la hipercapnia disminuyó la respuesta de las células bipolares ON (vías ON), lo cual se puso de manifiesto con *ondas b* de menor amplitud tanto en fotópico como en escotópico. Además, el ERG flicker en el perro tuvo un origen diferente en función de la frecuencia temporal de estímulo utilizada, representando mayoritariamente la actividad de los fotorreceptores a frecuencias temporales de estímulo bajas (6 Hz), y la de las vías ON y OFF a frecuencias de estímulo altas (30 Hz). Por otra parte, la hipercapnia redujo la respuesta de los fotorreceptores. Por último, los ERGs obtenidos de perros anestesiados con isoflurano o con sevoflurano fueron similares y adecuados para este tipo de registros cuando los utilizamos en normocapnia. La hipercapnia perturba la funcionalidad retiniana debido a la acidosis respiratoria que lleva asociada, sin embargo no se conoce el mecanismo celular exacto mediante el cual afecta selectivamente a las vías ON de la retina (sin alterar de manera

importante a las OFF). Podría deberse a una sensibilidad específica de los receptores metabotrópicos que solo poseen las células bipolares ON. En cualquier caso, creemos que la hipercapnia puede ser una herramienta útil y reversible en la separación para su estudio de las vías ON y OFF de la retina, como alternativa a algunos análogos del glutamato como el APB o el PDA, que requieren una técnica de aplicación específica y poseen ciertos efectos secundarios.

2.- SUMMARY:

In the present work, we studied the effects caused by two of the most used inhalant anaesthetics in veterinary medicine, isoflurane and sevoflurane. We have also evaluated the influence on the ERG of these anaesthetics, in normocapnic and hypercapnic conditions. For this purpose, we applied a recently published ERG protocol, that includes the photopic luminance-response function (“photopic hill”), the dark adaptometry (AERG), the single flash and the flicker ERG with 4 different temporal stimulus frequencies (6, 12, 20 y 30 Hz). This protocol was applied to 6 healthy beagle dogs under 4 different anaesthetics situations, performed in 4 well defined groups; ISON, ISOH, SEVON and SEVOH. ISON and ISOH groups were respectively made with isoflurane in normocapnic and hypercapnic conditions, SEVON group was made with sevoflurane and normocapnia and finally, SEVOH with sevoflurane and hypercapnia.

For the dogs within hypercapnic groups (ISOH and SEVOH) we have observed a significant reduction in the b-wave amplitude at I_{max} (V_{max}), and in the b-wave amplitude of minute 32 of the AERG (pure rod response). In contrast, the a-wave amplitude at I_{max} (A_{max}) did not undergo significant changes between the 4 groups. On the other hand, 6 Hz flicker had significantly smaller amplitude in the hypercapnic groups, whereas the amplitudes of the flicker ERGs of higher temporary frequencies (12, 20 and 30 Hz) were not modified. The implicit time of the 30 Hz flicker was higher in the hypercapnic groups. The obtained results suggest that, at the used stimulus intensities, the a-wave of dog ERG fundamentally reflected the retinal OFF-pathway activity, and was not significantly altered with hypercapnia. In addition, hypercapnia diminished the ON bipolar cells (ON-pathway) response, with smaller b-waves amplitudes in photopic and scotopic conditions. Furthermore, the dog flicker ERG had a different origin based on the temporary frequency from used stimulus, representing mainly the photoreceptors activity at low frequencies (6 Hz), and ON and OFF-pathways at high frequencies (30 Hz). On the other hand, hypercapnia reduced the photoreceptor response. Finally, the ERGs obtained from isoflurane or sevoflurane, anaesthetized dogs, were almost identical and these anaesthetics were suitable for this purpose when used in normocapnic conditions. Hypercapnia disturbs retinal functionality due to associate respiratory acidosis, nevertheless, the exact cellular mechanism that affects selectively the retinal ON-pathway (without significant alteration in OFF-pathway) is unknown. It may be due to a specific sensitivity of metabotropic receptors, presents only in the ON bipolar cells. In any case, we consider that hypercapnia can be a useful and reversible tool in the separation of ON and OFF retinal pathways, like alternative to some glutamate analogs like APB or PDA that requires a specific application technique, and have certain side effects.